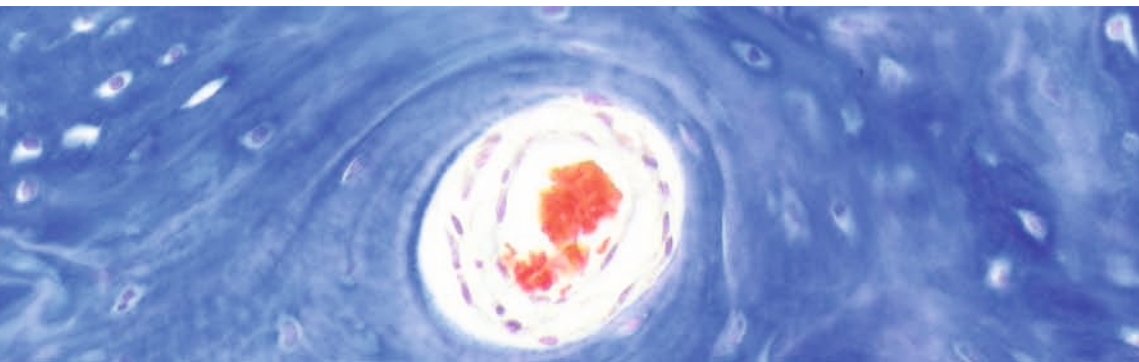


Rekonstruktion von kritischen Knochendefekten  
am Kiefer immundefizienter Ratten durch  
xenogene Transplantation humaner adulter  
fettabgeleiteter Stammzellen

---

**SVEN JÄCKEL**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem  
Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere, Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

**und**

dem  
Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. H.-P. Howaldt

**Rekonstruktion von kritischen Knochendefekten am Kiefer  
immundefizienter Ratten durch xenogene Transplantation humaner  
adulter fettabgeleiteter Stammzellen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Sven Jäckel Tierarzt aus Marburg/Lahn**

**Gießen 2012**

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer  
Prof. Dr. Dr. H.-P. Howaldt

Tag der Disputation: 22.11.2012

**Meinen Großeltern**  
**Anna und Wilhelm Bornmann**  
**gewidmet**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>5</b>
2.1. Stammzellen.....	5
2.1.1. <i>Embryonale Stammzellen (ESC)</i> .....	6
2.1.2. <i>Adulte Stammzellen (ASC)</i> .....	7
2.1.2.1. <i>Fettabgeleitete adulte Stammzellen (ADSC)</i> .....	9
2.2. Knochenbildung .....	15
2.3. Knochenaufbau .....	17
2.4. Frakturklassifikation .....	19
2.5. Frakturheilung .....	20
2.6. Frakturheilungsstörungen.....	21
2.7. Knochenersatz: Forschungsstand .....	22
2.7.1. <i>Autologe Knochentransplantate</i> .....	26
2.7.2. <i>Allogene Knochentransplantate</i> .....	28
2.7.3. <i>Xenogene Knochentransplantate</i> .....	29
2.7.4. <i>Biologische Knochenersatzstoffe</i> .....	30
2.7.5. <i>Synthetische Knochenersatzstoffe</i> .....	31
2.7.6. <i>Bone-Tissue-Engineering</i> .....	34
2.7.7. <i>Protected bone healing</i> .....	41
2.8. Critical-size Defektmodell des Knochens .....	43
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>44</b>
3.1. Fettabgeleitete Stammzellen .....	44
3.1.1. <i>Isolierung von ADSC</i> .....	44
3.1.2. <i>Passagieren der ADSC</i> .....	45
3.1.3. <i>Kryokonservierung der ADSC</i> .....	45
3.1.4. <i>Auftauen der ADSC</i> .....	45
3.1.5. <i>Kollagenscaffold</i> .....	46
3.1.6. <i>Besiedlung des Kollagenscaffolds</i> .....	46

3.1.7.	<i>Charakterisierung der ADSC mittels Durchflusszytometrie</i> .....	47
3.2.	In vivo Versuch Rekonstruktion von Unterkieferdefekten der immundefizienten Ratte ..	51
3.2.1.	<i>Versuchstiere</i> .....	52
3.2.2.	<i>Gruppeneinteilung und chirurgischer Eingriff</i> .....	52
3.2.3.	<i>Postoperative Phase</i> .....	55
3.2.4.	<i>Standzeiten und Versuchsabschluss</i> .....	56
3.3.	Auswertung des in vivo Versuchs.....	56
3.3.1.	<i>Flat-panel Volumen Computertomograph (fpvCT)</i> .....	56
3.3.2.	<i>Auswertung der Daten des fpvCT</i> .....	58
3.3.3.	<i>Histologische Untersuchung des in vivo neu gebildeten Knochens</i> .....	60
3.3.4.	<i>Untersuchung des in vivo neu gebildeten Knochens mittels eines Mikro-CT</i> .....	62
3.4.	Statistische Auswertung.....	64
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>66</b>
4.1.	Durchflusszytometrische Analysen.....	66
4.2.	Aufnahmen des fpvCT .....	69
4.2.1.	<i>Knochenvolumen</i> .....	69
4.2.2.	<i>Ossifizierte Defektfläche</i> .....	73
4.3.	Histologische Untersuchungen .....	76
4.4.	Mikro-Computertomographie .....	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>92</b>
5.1.	Diskussion der Methoden.....	92
5.1.1.	<i>Besiedlung und Art der Trägermaterialien</i> .....	92
5.1.2.	<i>Tiermodell</i> .....	94
5.1.3.	<i>Operationsmodell und Gruppeneinteilung</i> .....	95
5.1.4.	<i>Radiologische Methoden</i> .....	96
5.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	98
5.2.1.	<i>Durchflusszytometrische Analyse</i> .....	98
5.2.2.	<i>Knochenvolumen und ossifizierte Defektfläche</i> .....	101
5.2.3.	<i>Histologie</i> .....	103
5.2.4.	<i>Nachweis humaner Zellen</i> .....	105
5.3.	Ausblick für Veterinär- und Humanmedizin .....	106



<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>109</b>
<b>7.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>111</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
	<b>Kongresse.....</b>	<b>141</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>142</b>
A.	Reagenzien.....	146
B.	Lösungen.....	151
C.	Medien zur Kultivierung von Zellen.....	152
D.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	153
	<b>Erklärung.....</b>	<b>157</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>158</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADSC	adipose derived stem cells
BMSC	bone marrow stromal cells
BMP	bone morphogenetic protein
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomograph
D	dimensional
DICOM	digital imaging and communications in medicine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	elektronische Datenverarbeitung
ESC	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	hitzeinaktiviertes fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
fpvCT	flat-panel Volumen Computertomograph
g	Gramm
gbr	guided bone regeneration
G	Guanin
G	Schleuderziffer der Zentrifuge (x-faches der Erdbeschleunigung)
GB	Gigabyte

GFP	grün fluoreszierendes Protein
GHz	Gigahertz
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
hADSC	human adipose derived stem cells
HE	Hämatoxylin Eosin
HIV	humanes immundefizienz Virus
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HU	Hounsfield Einheit
IE	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IGF	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KV	Knochenvolumen
kV	Kilovolt
kVp	Kilovolt peak
M	Molar
mA	Milliampere
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
Mio	Millionen
MSC	mesenchymal stem cells
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NaOH	Natriumhydroxid

nm	Nanometer
OD	ossifizierte Defektfläche
OP	osteogenic protein
OP	Operation
pbh	protected bone healing
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	personal computer
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PLA	processed lipoaspirate cells
PTFE	Polytetrafluoräthylen
p-Wert	Signifikanzwert
RAM	random access memory
rhBMP	rekombinantes humanes bone morphogenetic protein
rmu	Rowett nude
ROI	region of interest
rpm	revolutions per minute
s.c.	subkutan
sek	Sekunde
S.E.M.	standard error of the mean
SPF	spezifisch pathogen frei
STRO-1	stromales Antigen 1
T	Thymin
TCP	Tricalciumphosphat
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
U	Umdrehung
v-CJD	variant Creutzfeld Jacob disease
VEGF	vascular endothelial growth factor
W	Watt

### 1. Einleitung

Die Therapie von angeborenen oder erworbenen Knochendefekten stellt, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin nach wie vor ein klinisches Problem dar. Es stehen hierfür die Transplantation von autologer Beckenkammspongiosa und die Einbringung von Knochenersatzmaterial zur Verfügung. Insbesondere bei Kindern bzw. kleinen Haustieren ist es nicht möglich, eine ausreichende Menge von autologem Knochentransplantat zu gewinnen, um große Knochendefekte erfolgreich zu therapieren. Die höhere Lebenserwartung und die damit einhergehende und zunehmende Krankheits- und Unfallanfälligkeit des Skelettsystems, werden zukünftig den Bedarf an Knochenaufbaumaterial weiter ansteigen lassen. Besonders in der Veterinärmedizin ist eine Ruhigstellung der betroffenen Regionen über einen längeren Zeitraum nur schwer möglich. Daher sind Methoden für eine schnelle und zuverlässige Heilung in den Vordergrund gerückt und gewinnen immer mehr an Bedeutung. Theoretisch lassen sich folgende Eigenschaften eines „idealen“ Knochenersatzes formulieren:

1. keine immunologischen Abstoßungsreaktionen
2. frei von toxischen oder mutagenen Nebenwirkungen
3. Sterilität
4. vollständiger knöcherner Ein- und Umbau
5. keine Mengen- und Lagerungsprobleme
6. freie Auswahl in Form und Größe
7. einfache Bearbeitbarkeit
8. niedrige Kosten
9. eine hohe biologische Potenz, dies bedeutet:
  - osteogenetische Wirkung durch zelluläre Knochenbildung.
  - osteoinduktive Wirkung durch Freisetzung von Knochenwachstumsfaktoren.
  - osteokonduktive Wirkung durch Leitschienenfunktion.

Trotz jahrelangem Einsatz von unterschiedlichen organischen und anorganischen Knochenersatzmaterialien, ist ein wirklicher Durchbruch im Sinne einer problemlosen Einsatztauglichkeit für die klinische Routine nicht erzielt worden. Zum einen ist es nicht gelungen die Implantateigenschaften so zu beeinflussen, dass ein ausreichend zuverlässiger und reproduzierbarer osteoinduktiver Effekt zur Defektheilung vom Implantat selbst ausgeht. Zum anderen sind die meisten Knochenersatzmaterialien den Beweis schuldig geblieben, zu einem

## 1. Einleitung

---

dauerhaften Remodelling im Sinne einer kompletten ossären Integration und damit zu einem definitiven Ein- und Umbau in der Lage zu sein (Schmid et al. 2007).

Der autologe Knochen wird in nahezu jeder Publikation, die sich mit der Problematik der Knochenregeneration beschäftigt, als der optimale Knochenersatz angesehen. Zuverlässigkeit, Verfügbarkeit, Wirksamkeit und das Fehlen von potentiellen Krankheitsübertragungen, machen den autologen Knochen zum „Goldstandard“ (St John et al. 2003). Die Stärken des autologen Knochentransplantats bestehen in den osteogenetischen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften. Bei der Diskussion der Erfolgsrate eines Knochenaufbaus durch ein autologes Knochentransplantat, darf die Gefahr des Transplantatverlustes beispielsweise durch Infektion und Resorption nicht unberücksichtigt bleiben. Bei Kindern, Schwerverletzten und Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand, stellt die Entnahme von großen Transplantaten, durch die damit verbundene Ausweitung des Operations- und Gewebetraumas, einen oftmals nicht vertretbaren Zweiteingriff dar (v. Garrel und Gotzen 1998).

Eine Alternative zum autologen Knochentransplantat stellt das allogene kryokonservierte Knochentransplantat dar. Hier beruht die ossäre Regenerationsleistung vor allem auf der osteokonduktiven und osteoinduktiven Potenz, die zum Transplantateinbau und infolgedessen zu einem schleichenden Abbau und Ersatz (*creeping substitution*) führen (v. Garrel und Gotzen 1998). Neben dem Vorteil der größeren Verfügbarkeit dieser Transplantate, gibt es eine Vielzahl an Nachteilen. Im Vordergrund steht dabei die Übertragung von viralen und bakteriellen Krankheitserregern und die noch vorhandenen antigenen Eigenschaften. Immunologische Reaktionen vermindern die Knochenneubildung und führen zur beschleunigten Resorption des Transplantats. Sie können beim Empfänger zu einer unerwünschten Antikörperbildung führen (Lee et al. 1997). Um das Infektionsrisiko zu minimieren, ist ein großer Aufwand bezüglich der Spenderselektion und ein entsprechendes Knochenbankmanagement notwendig (v. Garrel und Gotzen 1998).

Da sich die Regeneration von großen Knochendefekten oft schwierig gestaltet und die Verfügbarkeit von Knochentransplantaten beschränkt ist, werden große Hoffnungen auf neue *tissue engineering* (Gewebezüchtung) Strategien zur Behandlung großer Knochendefekte gesetzt. Ziel des *tissue engineering* ist es, natürliches und funktionelles Knochengewebe aus lebenden Zellen zu regenerieren, um Defekte, verlorenes Gewebe oder kompromittierte Organe zu ersetzen. *Tissue engineering* integriert dazu die neusten Erkenntnisse der Molekularbiologie, Biochemie, der Ingenieurwissenschaften, Materialwissenschaften und der Transplantationsmedizin (Unger et al.

2009). *Bone tissue engineering* bietet eine vielversprechende, alternative Strategie, um ausgedehnte Knochenverletzungen zu heilen (Patka et al. 1998). Viele verschiedene Materialien werden derzeit zur Verwendung als Biomaterial bzw. *scaffold* (Trägermaterial) für Knochenheilung und Knochenregeneration verwendet und weiterentwickelt. Diese Materialien und ihre Beschaffenheit bestimmen nicht zuletzt die mechanischen Eigenschaften der dreidimensionalen Struktur (Bottaro et al. 2002). Biokompatible und resorbierbare *scaffolds* sollen eine reproduzierbare und patientenindividuelle Therapie ermöglichen, welche die mit allogener Transplantation verbundenen Immunreaktionen minimiert (Dupoirieux et al. 1994). *Scaffolds* sollten heutzutage Bedingungen wie Biokompatibilität, strukturelle Stabilität, Osteoinduktion und Osteokonduktivität erfüllen und mit dem Implantationssitus eine biomolekulare Interaktion eingehen, um eine optimale Regeneration zu ermöglichen (Unger et al. 2009). Bei den Materialien, die für Therapien basierend auf *bone tissue engineering* eingesetzt werden, handelt es sich entweder um synthetische, jedoch resorbierbare Materialien, wie z. B. „*polylactic acid*“, „*polyglycolic acid*“, „*polylactic-glycolic acid*“ und vernetztes „*polyethylene glycol*“ oder um natürliche Materialien wie z.B. Kollagen, Hyaluronsäure, Hydroxylapatit oder Calciumcarbonat (Levenberg und Langer 2004) und deren Komposite.

In der Regenerativen Medizin haben sich in der Vergangenheit Stammzellen als ein weiteres Behandlungskonzept im *bone tissue engineering* und als Alternative zum autologen Knochentransplantat abgezeichnet. Insbesondere fettabgeleitete adulte Stammzellen sogenannte *adipose derived stem cells* (ADSC) können einfach ohne ethische Bedenken in einem standardisierten Routineeingriff gewonnen werden. Diese ADSC haben die Eigenschaft, sich innerhalb ihres Keimblattes in Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myozyten zu differenzieren. Sie sind damit sowohl in vivo wie auch in vitro dazu geeignet, nach einem Differenzierungsprozess Knochengewebe zu bilden (Zuk et al. 2002; De Ugarte et al. 2003; Arrigoni et al. 2009). Die ADSC werden im Zuge von kosmetischen Operationen aus Liposuktionsflüssigkeit oder bei Routineoperationen aus nativem Fettgewebe isoliert und dem Patienten in einem Trägermaterial reimplantiert. Vorteil der autologen ADSC beim Einsatz im *bone tissue engineering* ist die fehlende Gefahr von Immunreaktionen, ihre hohe biologische Potenz, die einfache Gewinnung und Kultivierbarkeit und die geringen Kosten.

Im Mai 2003 erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Gießen in einem Heilversuch die Rekonstruktion von Schädelkalottendefekten. Dieser Rekonstruktionsversuch wurde bei einem 7-jährigen Kind mittels Beckenkammspongiosa, einer resorbierbaren makroporösen Membran und autologen ADSC,

## 1. Einleitung

---

eingebettet in autologem Fibrinkleber durchgeführt. Der Heilverlauf zeigte sich komplikationslos und in den durchgeführten radiologischen Kontrollen konnte eine deutliche Ossifikation im Bereich der ehemaligen Defekte bestätigt werden (Lendeckel et al. 2004). Im Rahmen dieser Fallbeschreibung war es jedoch nicht möglich zu unterscheiden, ob die Knochenneubildung von den eingebrachten ADSC ausging oder ob die alleinige Transplantation von Beckenkammpongiosa ausreichend gewesen wäre, um die entstandene Heilung zu erzielen. Basierend auf dieser Arbeit dient vorliegende Studie der Beurteilung der osteogenen Potenz von humanen ADSC bei der Regeneration eines kritischen Knochendefektes am Kieferwinkel einer immuninkompetenten Ratte. Hierbei wurden regenerative Therapien wie autologe Knochentransplantate, *protected bone healing* und stammzellbasierende Verfahren miteinander in einer *split-mouth* Studie angewandt und mit radiologischen und histologischen Methoden miteinander verglichen. Diese Untersuchung soll das Fundament für mögliche neuartige Therapiekonzepte bei der Regeneration von kritischen Knochendefekten durch ADSC legen.

Das Ziel dieser Arbeit ist, humane ADSC zu gewinnen, *in vitro* zu vermehren und zu charakterisieren. Die Regeneration eines kritischen Knochendefektes an der Mandibula der immundefizienten Ratte mit ADSC, die in verschiedenen Trägermaterialien transplantiert werden, sollen untereinander und mit dem autologen Knochenmaterial als „Goldstandard“ des Knochenersatzes verglichen werden. Ebenso sollen die zugrunde liegenden Reparationsmechanismen bei der Therapie dieser kritischen Knochendefekte mittels ADSC geklärt werden.



## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Stammzellen

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, welche sich durch zwei Haupteigenschaften von anderen Körperzellen unterscheiden. Sie können sich zum einen in verschiedene Zelltypen oder Gewebe ausdifferenzieren, zum anderen sind Stammzellen in der Lage, Tochterzellen zu generieren, welche selbst wiederum Stammzeleigenschaften besitzen. Je nach Art der Stammzelle und ihrer Beeinflussung haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe (embryonale Stammzellen) oder in bestimmte festgelegte Gewebetypen (adulte Stammzellen) zu entwickeln. Daher unterscheidet man Stammzellen durch ihr Differenzierungspotenzial und ihren Ursprung (Beier 2002).

Totipotenz: Man bezeichnet in der Zellbiologie Stammzellen als totipotent, wenn sie eine uneingeschränkte Differenzierungsfähigkeit besitzen und in geeigneter Umgebung, wie z.B. dem Uterus noch zu einem kompletten Organismus heranwachsen können. Zu ihnen gehören die embryonalen Stammzellen. Vermutet wird eine Totipotenz von embryonalen Säugetierstammzellen bis zum 8-Zell-Stadium (Beier 2002).

Pluripotenz: Pluripotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich zu Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) und der Keimbahn eines Organismus zu entwickeln. Sie sind noch auf keinen bestimmten Gewebetyp festgelegt und können daher zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren (Beier 2002).

Multipotenz: Diese Stammzellen sind schon gewebsspezifisch differenziert und können sich in der Regel lediglich zu verschiedenen Zelltypen ihres ursprünglichen Keimblattes entwickeln. Sie sind aber nicht mehr in der Lage, sich zu nahezu jeder Körperzelle zu entwickeln. Hierzu zählen die adulten Stammzellen (Blum 2007).

Diese klassische Aufteilung musste jedoch revidiert werden, seitdem bekannt ist, dass sich multipotente Stammzellen unter bestimmten Voraussetzungen in pluripotente Stammzellen

entdifferenzieren können und somit in der Lage sind, Gewebe außerhalb ihres ursprünglichen Keimblattes bilden zu können (Blum 2007).

Stammzellen besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung im Sinne einer asymmetrischen Zellteilung, hieraus entwickeln sich Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen sind determinierte Zellen mit einer begrenzten Fähigkeit zur Selbsterneuerung, die sich in die spezialisierten Zelltypen der Ursprungsgewebe (z.B. Nervenzellen, Knochenzellen) entwickeln bzw. differenzieren können. Idealerweise sollten Stammzellen für die Anwendung in Medizin und Forschung folgende Kriterien aufweisen (Gimble 2003):

1. Isolierbarkeit in großer Menge und einfache Vermehrung in Zellkultur.
2. Einfaches Entnahmeverfahren ohne Entnahmemorbidität.
3. Hohes Differenzierungspotential in möglichst viele Zelllinien.
4. Unkomplizierte autologe oder allogene Transplantation.
5. Können in Übereinstimmung mit den gegenwärtigen guten Produktionspraxisrichtlinien bearbeitet werden (Gimble 2003).

Ihrem Ursprung nach werden Stammzellen in embryonale Stammzellen und adulte Stammzellen unterteilt.

### **2.1.1. Embryonale Stammzellen (ESC)**

Embryonale Stammzellen werden dem Embryo im sogenannten Blastozystenstadium entnommen. In der embryonalen Entwicklung bildet sich aus der Morula, einem kugeligen Zellhaufen aus 8 bis 32 Zellen (Blastomeren), der nach den ersten Teilungen aus der Zygote hervorgegangen ist, durch Epithelialisierung eine äußere Blastomere (Trophoblast) und die innere Zellmasse (Embryoblast). Hieraus entwickelt sich schließlich der gesamte Organismus. Somit haben die aus der inneren Zellmasse isolierten frühen embryonalen Stammzellen noch die Potenz, sich in alle drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu differenzieren, jedoch sind die Zellen in diesem Stadium nicht mehr totipotent (Beier 2002; Wislet-Gendebien et al. 2005). Embryonale Stammzellen können auf drei Arten gewonnen werden:

1. Aus überzähligen Embryonen bei in vitro Fertilisationen.
2. Aus abortierten Feten werden primordiale Keimzellen nach legal induziertem oder spontanem Abort aus fünf bis neun Wochen alten Feten isoliert.

3. Es werden aus therapeutischen Klonen embryonale Stammzellen gewonnen, dabei wird einer Eizelle der Zellkern entnommen. In diese Eizelle wird der Zellkern einer anderen Körperzelle eingebracht. Es entsteht dadurch eine Zelle, die sich wie ein normaler Embryo bis zum Blastozystenstadium weiterentwickelt (Döhmen und Reis 2002).

Der Forschung mit embryonalen Stammzellen, vor allem humanen ESC, stehen ethische Bedenken entgegen. Daher ist sie durch politische wie auch rechtliche Aspekte (vgl. Gesetz zum Schutz von Embryonen) stark reglementiert (Brewer 2006). Weitere Nachteile sind ihre schwierige Gewinnung und Kultivierung, da sie sich in Kultur oft früh spontan differenzieren und die gerichtete Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp kompliziert ist (Heng et al. 2004).

### 2.1.2. Adulte Stammzellen (ASC)

Adulte Stammzellen können aus Geweben endodermalen, mesodermalen oder ektodermalen Ursprungs gewonnen werden. Sie bilden in Analogie zu den embryonalen Stammzellen meist Vorläuferzellen, so genannte „*progenitor cells*“, bevor sie endgültig ausdifferenzieren. Diese Vorläuferzellen besitzen zwar noch Differenzierungspotential, dieses ist aber deutlich eingeschränkt. So können sich aus hämatopoetischen Vorläuferzellen nur noch spezialisierte Hämatocyten entwickeln. Adultes Knochenmark, sowie das Gehirn, Lebergewebe, Bauchspeicheldrüsengewebe, Skelettmuskelgewebe (Passier und Mummery 2003), Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Knochengewebe, Knorpelgewebe, Zahnpulpa, Cornea und die Retina besitzen Stammzellen zur organspezifischen Regeneration. Die Differenzierung der adulten Stammzellen zu spezialisierten Zellen außerhalb des ursprünglichen Gewebes, aber innerhalb desselben Keimblattes, wird unter anderen von Ferrari (1998) und Gussoni et al. (1999) beschrieben. Eine Differenzierung außerhalb des ursprünglichen Keimblattes hingegen erscheint unmöglich zu sein, jedoch kann experimentell gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zu Zellen mit neuronalen Eigenschaften differenzieren, die sich ontogenetisch aus dem Ektoderm ableiten (Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000). Dieses Phänomen wird als Transdifferenzierung bezeichnet. Andere Forschergruppen zeigen, dass es in vitro möglich ist durch eine kurze Reaktivierung verschiedener Reprogrammierungsfaktoren, somatische Zellen bzw. embryonale und adulte Fibroblasten sicher zu pluripotenten Zellen zu entdifferenzieren (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007; Park et al. 2008; Efe et al. 2011). Vorteile der ADSC gegenüber den embryonalen Stammzellen ist die Möglichkeit zur autologen und damit immunsuppressionsfreien Transplantation beim Gewebersatz, die ethische Unbedenklichkeit der Stammzelltherapie und die

## 2. Literaturübersicht

---

geringere Tendenz zur Entartung in Tumorgewebe. Daher stellen adulte Stammzellen zum jetzigen Zeitpunkt eine sehr attraktive Alternative zu embryonalen Stammzellen in der Forschung dar.

Hämatopoetische-Stammzellen (HSC) sind gut charakterisierte Zellen mesodermalen Ursprungs. Sie schaffen die Grundlage für Knochenmark-Verpflanzungsverfahren (Bellantuono 2004). HSC befinden sich in erster Linie im Knochenmark und sind für die Bildung aller reifen Blutzelltypen des hämatolymphatischen Systems einschließlich Monozyten/Makrophagen, basophilen-, eosinophilen- und neutrophilen Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen, sowie B- bzw. T-Lymphozyten verantwortlich. Wie man gezeigt hat können HSC auch in andere Zelllinien ausdifferenzieren (Fortier 2005). Das erwachsene Knochenmark enthält in enger Nachbarschaft zu den HSC auch stromale Knochenmarkszellen (bone marrow stromal cells, BMSC), welche zur Regeneration von mesenchymalen Geweben wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bänder, Sehnen und Fett beitragen. Friedenstein et al. (1968, 1966) beschreiben erstmals in ihren Arbeiten die Isolation von adhärenenten und fibroblastenähnlichen Zellen, die sowohl zu Osteoblasten, Chondrozyten wie auch Adipozyten ausdifferenzieren können und aus einer Knochenmarkssuspension gewonnen werden. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um Stammzellen handelt. Die Beobachtungen zeigen, dass diese Zellen unter dem Einfluss der jeweiligen Umgebung in fast alle mesodermalen Gewebe ausdifferenzieren können. In weiteren Studien wird gezeigt, dass auch eine Transdifferenzierung von BMSC zu neuronalen Zellen bzw. neuronalen Vorläuferzellen in vitro möglich ist (Sanchez-Ramos et al. 2000; Woodbury et al. 2000; Deng et al. 2001). Üblicherweise erfolgt die Isolation von mesenchymalen Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSC) aus Knochenmark. Durch Punktion des Beckenkammes werden 10-40 ml Knochenmarkaspirat gewonnen. Die mesenchymalen Stammzellen werden von den übrigen Zellen in vitro durch ihre kunststoffadhärenenten Eigenschaften getrennt (Pittenger et al. 1999). Knochenmarkentnahmen können, besonders ab größeren Volumina sehr schmerzhaft sein. Daher wird oft eine allgemeine oder spinale Anästhesie empfohlen (Auquier et al. 1995; Nishimori et al. 2002). Die Konzentration der residenten Stammzellen in den verschiedenen Organen ist organspezifisch und meist gering. Lediglich 0,01-0,001% der aus Knochenmark isolierten mononukleären Zellen führen zu stammzellbildeten Kolonien in vitro. Durch die in vitro Kultivierung kann man jedoch ihre Anzahl schnell von Hunderten zu Millionen steigern (Pittenger et al. 1999). Eine alternative Quelle gegenüber MSC aus Knochenmark ist Nabelschnurblut, welches ohne Schaden für die Mutter oder den Säugling gewonnen werden kann (Rubinstein et al. 1993). Es bestehen in einigen Forschergruppen auch Zweifel, ob Nabelschnurblut als eine Quelle

zur Isolierung von multipotenten MSC dienen kann (Mareschi et al. 2001; Wexler et al. 2003). Die Erfolgsrate ist mit etwa 29% gegenüber der Isolierungserfolgsrate von Stammzellen aus Knochenmark oder Fettgewebe mit 100% gering. Die Fähigkeiten zur Ausdifferenzierung in verschiedene Zelllinien ist bei Stammzellen aus Nabelschnurblut weniger stark ausgeprägt (Kern et al. 2006).

### 2.1.2.1. Fettabgeleitete adulte Stammzellen (ADSC)

Fettgewebe ist als weißes und braunes Fettgewebe im Körper vorhanden. Weißes Fettgewebe fungiert primär als Triglyceridspeicher. Braunes Fettgewebe dient primär in neugeborenen Säugetieren als Energielieferant zur Thermogenese (Gesta et al. 2007). Als eine neue Alternative zu MSC aus Knochenmark, haben verschiedene Forschergruppen eine Population von Zellen in menschlichem Fettgewebe isolieren können, sogenannte processed lipoaspirate cells (PLA). Diese Zellen scheinen ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen aufzuweisen und können bei kosmetischen Operationen aus Liposuktionsflüssigkeit oder bei Routine-Operationen aus nativem Fettgewebe isoliert werden. Anschließend werden sie den Patienten autolog reimplantiert (Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2001; Erickson et al. 2002). Vergleicht man den Ertrag von adhären Zellen in Kultur, Wachstumskinetik, Zellalterung, das Differenzierungspotential in verschiedene Zelllinien von fettabgeleiteten Stammzellen und MSC aus Knochenmark, so kommt man zu folgenden Ergebnissen: Die Anzahl von kernhaltigen Zellen pro Gramm Knochenmark ist bedeutsam höher als pro Gramm des fetthaltigen Gewebes. Jedoch sind in den Knochenmarksproben zumeist auch andere Zelllinien wie z.B. hämatopoetische Zellen festzustellen, so dass sich im Ertrag nach 2 Wochen in vitro Kultivierung bei den isolierten adhären Stammzellen keine bedeutenden Unterschiede ergeben (De Ugarte et al. 2003). 1g Fettgewebe enthält circa  $5 \times 10^3$  Stammzellen, was fünfhundertmal mehr Stammzellen sind als in einem Gramm Knochenmark (Mizuno 2009). Es werden keine bedeutenden Unterschiede für das auf die  $\beta$ -Galactosidase Tätigkeit beruhende Zellaltern beobachtet. Es werden weiterhin keine bedeutsamen Unterschiede zwischen PLA Zellen und MSC aus Knochenmark für Fettzellmarker und Knochenzellmarker beobachtet. Die hohe in vitro Vermehrungsrate und die Selbsterneuerung sind notwendige Eigenschaften von PLA Zellen und wichtig für ihren Gebrauch in der Gentherapie und dem Gewebeersatz. Zusammenfassend ist Fettgewebe eine leicht in ausreichender Menge zu beschaffende autologe Quelle für Stammzellen. (De Ugarte et al. 2003). Vorteile dieser ADSC gegenüber MSC aus Knochenmark sind die einfache Isolierung in großer Anzahl ohne größere Schmerzen für den Patienten. Fettgewebe ist mit mindestens 4% eine der größten Gewebetypen im

## 2. Literaturübersicht

---

adulten menschlichen Körper und damit wahrscheinlich eine der reichsten Quellen an adulten Stammzellen überhaupt. Somit ist Fettgewebe ein reichhaltiges und vielversprechendes Gewebe für den autologen Zellersatz und die Reparatur von Geweben (Witkowska-Zimny und Walenko 2011). Sun et al. (2009) belegen auch die kürzeren Kultivierungszeiten und die erhöhte Effizienz der ADSC gegenüber einer Kultivierung und Entdifferenzierung von Fibroblasten zu pluripotenten Zellen.

Bis Anfang des 21. Jahrhunderts wird vermutet, dass der Wachstumsprozess des Fettgewebes und damit der Fettzellen von unipotenten Vorläuferzellen (Praedipocytes) ausgeht. Doch es wird immer mehr klar, dass diese Zellen ein beeindruckendes Potential der Differenzierung auch außerhalb der Fettzelllinie besitzen (Zuk et al. 2001; Erickson et al. 2002; Safford et al. 2002; Zuk et al. 2002; Gimble und Guilak 2003). Eine Vielzahl von Bezeichnungen wird zur Beschreibung dieser multipotenten, kunststoffadhärenten Zellpopulation aus Fettgewebe benutzt. Wie schon im obigen Abschnitt erwähnt, werden sie früher oft als processed lipoaspirate cells, Präadipozyten oder Stammzellen aus Fettgewebe beschrieben (Schäffler und Büchler 2007). Die Internationale *Fat Applied Technology Society* empfiehlt die Bezeichnung solcher fettabgeleiteter Stammzellen als „adipose-derived stem/stromal cells“ (ASC oder ADSC) (Nakagami et al. 2006), diese Bezeichnung wird im Weiteren verwendet. In zwei 2001 und 2002 veröffentlichten Arbeiten beschreiben Zuk et al. (2002; 2001) erstmals ein genaues Protokoll zur Isolierung und Kultivierung von Stammzellen aus Liposuktionsflüssigkeit und bezeichnen diese Zellen als *human adipose derived stem cells* (hADSC). Es sind kunststoffadhärente, fibroblastenähnliche Zellen, welche in vivo dazu gebracht werden können, zu Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myozyten auszudifferenzieren. ADSC können bisher aus dem Fettgewebe zahlreicher Tierarten wie Maus (Mizuno et al. 2008), Ratte (Tholpady et al. 2003; Yoshimura et al. 2007), Kaninchen (Follmar et al. 2006; Peptan et al. 2006; Torres et al. 2007), Hund (Neupane et al. 2008), Schwein (Qu et al. 2007; Williams et al. 2008) und Pferd (Vidal et al. 2007; Del Bue et al. 2008) isoliert werden. Die Isolation erfolgt aus Liposuktionsflüssigkeit oder nativem Fettgewebe. Die Zellen können bei kosmetischen Fettabsaugungen (Liposuktionsflüssigkeit) zu circa  $1 \times 10^6 / 200$  ml isoliert werden (Strem et al. 2005). Aus 100 ml des menschlichen nativen Fettgewebes kann man circa  $1 \times 10^6$  Stammzellen gewinnen (Meliga et al. 2007). Um Stammzellen aus Fettgewebe zu isolieren, wird die Probe gründlich mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, anschließend mit Kollagenase verdaut und die Probe zu einem Zellpellet abzentrifugiert. Dieses wird resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausplaziert (Zuk et al. 2001). Die zur Verfügung stehenden Protokolle zur

## 2. Literaturübersicht

---

Isolierung von ADSC beruhen im Wesentlichen auf Digestion, Dichtegradienten und Kunststoffadhärenz. Diese kultivierten Stammzellen kann man später auf ihre charakteristischen Oberflächenantigenexpressionsmuster untersuchen. ADSC verdoppeln ihre Population in Kultur innerhalb 2-4 Tagen in Abhängigkeit des Spenderalters, der Art des Fettgewebes (braunes oder weißes Fettgewebe), der Dichte bei Ausplazierung und der Zusammensetzung des Expansionsmediums (Mizuno 2009). Die Multipotenz von Stammzellen wird vielfach erforscht. ADSC als Zellen mesenchymalen Ursprungs können sich innerhalb ihres Keimblattes in Adipozyten, Osteozyten, Chondrozyten sowie zu Skelettmuskelzellen, glatten Muskelzellen, Endothelzelle, und Kardiomyozyten ausdifferenzieren (Halvorsen et al. 2001; Mizuno et al. 2002; Zuk et al. 2002; Huang et al. 2004; Ogawa et al. 2004; Lee und Kemp 2006; Natesan et al. 2011). Auch die Möglichkeit von ADSC Zelllinien außerhalb ihres Keimblattes in neuronenartige Zellen (Safford et al. 2002; Ashjian et al. 2003), in Epithelzellen (Brzoska et al. 2005), Hepatozyten (Seo et al. 2005), Pankreaszellen (Timper et al. 2006) sowie Zellen des hämatopoetischen Systems (Corre et al. 2006) zu differenzieren sind bekannt. Aufgrund der Fähigkeit von ADSC mehrere Zelltypen aller drei Keimblätter zu bilden, werden sie von vielen Forschergruppen vermehrt zu den pluripotenten Zellen gezählt und können somit eine Alternative zu embryonalen Stammzellen darstellen (Zuk 2010; Witkowska-Zimny und Walenko 2011).

Ein spezifischer Oberflächenmarker für undifferenzierte ADSC wurde bisher nicht gefunden. Es sind jedoch einige Oberflächenmarker fast immer vorhanden, daher kann man aufgrund einer Kombination von Oberflächenmarkern Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Stammzellen schließen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich diesem Thema angenommen, sind jedoch zu leicht unterschiedlichen Oberflächenantigenmustern von ADSC gekommen (Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2001, 2002).

1. Adhäsionsmoleküle: CD9, CD29, CD49d, CD54, CD105, CD106 und CD 166
2. Rezeptor Moleküle: CD44, CD71
3. Oberflächenenzyme: CD10, CD13 und CD73
4. Extrazelluläre Matrix Proteine und Glykoproteine: Typ I und Typ II Kollagen, Osteopontin, Osteonectin, CD90 und CD146
5. Skelettproteine: intrazelluläres glattes Muskel Aktin und Vimentin
6. Regulationsproteine: CD55, CD 59
7. Klasse 1 Histocompatibility Protein HLA-ABC (Gimble und Guilak 2003).

## 2. Literaturübersicht

---

Die hierbei wichtigsten Oberflächenantigene zur Identifikation von ADSC sind CD13, CD29, CD90, CD 44, CD 49d, CD 105, CD 166 und STRO 1 (Zuk et al. 2001, 2002; Gimble und F. Guilak 2003; Strem et al. 2005; Meliga et al. 2007). Gronthos et al. (2001) entdecken CD106 auf ADSC, während Zuk et al. (2002) diese Marker nicht nachweisen. Andererseits haben Zuk et al. (2002) STRO-1 nachweisen können, Gronthos et al. (2001) aber nicht. Nicht alle Laboratorien verwenden Zellen in gleichen Passagen, daher haben Mitchell et al. (2006) die Expression der Oberflächenmarker von frisch isolierten ADSC mit ADSC in erster, zweiter, dritter und vierter Passage verglichen, mit dem Ergebnis, dass sich der immunologische Phänotyp in Abhängigkeit von Passage und Adhärenz progressiv ändert. Die Marker CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD166 sind in einer frisch isolierten Stammzellpopulation auf relativ wenig Zellen zu finden (0,8-54%), jedoch nimmt ihre Anzahl in den folgenden vier Passagen bedeutend zu (bis zu 98%). Der Marker CD34 ist in einer frisch isolierten Stammzellpopulation fast immer auf der Zelle nachzuweisen (60%), jedoch ging seine Anwesenheit in den höheren Passagen zurück (1,7%). Mesenchymale Stammzellen können in vitro zur Knochenzellendifferenzierung mit Hilfe von Dexamethason, Ascorbat-2-Phosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat gebracht werden. Die Differenzierung in die osteogene Zelllinie wird anhand der Zellmorphologie, der alkalinen Phosphatase Tätigkeit und des Calciumgehaltes überprüft (Pittenger et al. 1999).

In der Humanmedizin wird bisher nur von wenigen Fällen berichtet, in denen fettabgeleitete Stammzellen zur Knochenheilung und Regeneration eingesetzt wurden. Lendeckel et al. (2004) haben Schädelkalottendefekte bei einem 7-jährigen Kind mittels Beckenkammspongiosa, einer resorbierbaren makroporösen Membran und ADSC, die aus subkutanem Fettgewebe während der Entnahme von Beckenkammspongiosa gewonnen wird, rekonstruiert. Der Heilungsverlauf zeigte sich komplikationslos. Mesimäki et al. (2009) berichten über die Entwicklung eines einzeln angefertigten mikrovaskulären ektopen Knochentransplantats aus autologen ADSC, welches einem Patienten mit Hemimaxillektomie eingesetzt wurde. Weiterhin werden autologe ADSC benutzt, um die Eigenfetttransplantation zu verbessern (Matsumoto et al. 2006) und um ischämische Verletzungen durch Strahlentherapie zu reduzieren (Rigotti et al. 2007). Bei kosmetischen Eingriffen wie der Behandlung von Gesichtsfalten und Brustvergrößerungen wurden ADSC ebenfalls eingesetzt (Yoshimura et al. 2008). ADSC in Kombination mit Fibrinkleber scheinen eine wirksame und sichere Behandlung für komplexe perianale Fisteln zu sein und erreichen eine bessere Heilung als ausschließlich Fibrinkleber (Garcia-Olmo et al. 2009; Taxonera 2009). In vorläufigen Studien kann gezeigt werden, dass eine periurethrale Injektion von autologen ADSC



eine sichere und praktikable Behandlungsmethode für Belastungs-Inkontinenz ist (Yamamoto et al. 2010).

In der Veterinärmedizin beschränkt sich die Anwendung von ADSC in der Frakturheilung in erster Linie auf experimentelle Studien, in denen diese neuen Therapiemöglichkeiten bei einzelnen Patienten überprüft wird. Stammzellen gewonnen aus Knochenmark, Fettgewebe, der Nabelschnur, und dem Nabelschnur-Blut werden zurzeit experimentell und klinisch beim Pferd eingesetzt (Carstam et al. 2006). Es ist gezeigt worden, dass Stammzellen aus sternalem Knochenmark oder subkutanem Fettgewebe von Fohlen und adulten Pferden das Potential für den Gebrauch im Gewebeersatz besitzen (Vidal et al. 2007). Dennoch sind bisher keine klinischen Anwendungen von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark oder aus Fettgewebe zur Frakturheilung beim Pferd beschrieben worden (Vertenten et al. 2010). Frisbie et al. (2009) untersuchen die klinischen, biochemischen, und histologischen Effekte intraartikulär verabreichter ADSC und MSC aus Knochenmark für die Behandlung von Osteoarthritis. Die Ergebnisse dieser Studie sind allerdings nicht aussagekräftig genug, um den Gebrauch von Stammzellen für die Behandlung von Osteoarthritis zu empfehlen. Besonders interessant sind aber die Möglichkeiten ADSC bei der Therapie der Tendinopathie beim Pferd einzusetzen (Richardson et al. 2007; Koch et al. 2008; Nixon et al. 2008), da Studien mit mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark bereits erste Erfolge bei der Therapie von Sehnenläsionen zeigen (Pacini et al. 2007; Smith 2008; Schnabel et al. 2008). Niemeyer et al. (2010) vergleichen das osteogene Differenzierungspotential von MSC aus Knochenmark und ADSC und den Einfluss von thrombozytenreichem Plasma auf die osteogene Kapazität von ADSC in einem *critical size defect* Modell (Defekt, welcher nicht ohne eine Therapie während der Lebenszeit des Tiers ausheilt) an der Tibia des Schafes. Mineralisierte Kollagenschwämme wurden mit MSC aus dem Knochenmark von Schafen (BMSC-Gruppe) und ADSC (ADSC-Gruppe) beimpft und in einen *critical size defect* der Schaftibia (jede Gruppe n=5) transplantiert. In einer zusätzlichen Gruppe wird thrombozytenreiches Plasma in Kombination mit ADSC (PRP-Gruppe n=5) verwendet. Unbehandeltes mineralisiertes Kollagen (leere-Gruppe) diente als Kontrolle (n=5). Alle 2 Wochen wird eine radiologische Untersuchung und nach 26 Wochen eine histologische Analyse der Proben durchgeführt. Die radiologischen Untersuchungen zeigen einen höheren neugebildeten Knochenanteil in der BMSC-Gruppe im Vergleich zur ADSC-Gruppe in Woche 10 und im Vergleich zur Kontrollgruppe ab der 12 Woche. Die histologischen Analysen bestätigen diese Befunde. Daher scheinen, zumindest in einem Tiermodell mit Schafen,

## 2. Literaturübersicht

---

ADSC ein geringeres osteogenes Potential als BMSC zu haben, was aber teilweise durch das Hinzufügen von thrombozytenreichem Plasma kompensiert werden kann.

Runyan et al. (2010) entnehmen Schweinen die Mandibula, diese wird sterilisiert und mit einem Kollagenschwamm und autologen, kulturexpandierten porcinen ADSC bestückt. Die Unterkiefer werden in 10 Schweine in 2 Positionen transplantiert: intercostal in einen periostalen Umschlag und in den Musculus rectus abdominis. Die Proben werden für 7 bis 8 Wochen in vivo belassen und anschließend radiologisch und histologisch die de novo Knochenbildung bewertet. Die Allotransplantate in der Abdominalregion haben einen dünnen Rand neugebildeten Knochens, der von einem fibrotischen Kern umgeben war. Die Allotransplantate in der Brustregion sind völlig absorbiert und durch neugebildeten Knochen ersetzt. Diese Studie zeigt die bedeutende Rolle des Periosts in diesem Prozess. Fotuhi et al. (2007) untersuchen die Wirkung der intracoronaren Verabreichung frisch isolierter ADSC auf die Induktion von Arrhythmien nach einem künstlich erzeugten myocardialen Infarkt in einem experimentellen Schweinmodell. In die Infarktarterie wird bei der Hälfte der Tiere eine Zellsuspension mit frisch isolierten ADSC eingespritzt. Trotz der vergleichbaren Infarktgröße in beiden Gruppen zeigt sich, dass die Zykluslänge der künstlich erzeugten ventrikulären Arrhythmien in der ADSC-behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren bedeutend länger ist. Die Autoren finden ebenfalls heraus, dass Extrastimuli für die Induktion der Arrhythmien in der mit ADSC behandelten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren erforderlich sind. Daraus folgern sie, dass die frisch isolierte autologe Stammzelltherapie nicht arrhythmisch in Schweinen wirkt. Rigol et al. (2010) untersuchen histologische und funktionelle Effekte von ADSC nach Implantation in Myokardinfarktregionen von Schweinen. Es ist die erste Studie, um eine intracoronare und transendocardiale Verabreichung von autologen ADSC in einem Schweinmodell des Myokardinfarktes zu vergleichen. Beide Wege der ADSC Verabreichung sind durchführbar, beide Methoden ergeben eine ähnliche Zahl von transplantierten und differenzierten ADSC in der Infarktregion, obwohl eine intracoronare Verabreichung durch eine erhöhte Neovaskularisation wirksamer ist. Liu et al. (2009) isolieren ADSC aus subkutanem caninem Fettgewebe, kultivieren diese und induzieren eine osteogene Differenzierung in vivo, danach werden sie auf *scaffolds*, welche aus dem Exoskelett von Korallen bestehen, aufgebracht. Es werden bilaterale Schädelknochendefekte (20mm x 20mm) erzeugt und mit *scaffolds* (Kontrollgruppe) und mit ADSC besiedelten *scaffolds* (experimentelle Gruppe) bestückt. Radiologische, biomechanische und histologische Untersuchungen der Defektregionen folgen, um die Knochenregeneration zu bewerten. Die Auswertung der CT-Bilder zeigt, dass neuer

Knochen in der experimentellen Gruppe innerhalb 12 Wochen nach der Implantation gebildet wird, während in der Kontrollgruppe eine erniedrigte Knochenneubildung festgestellt wird. Die histologische Untersuchung der Defektregion zeigt, dass der Defekt durch ein typisches Knochengewebe in der experimentellen Gruppe geschlossen wird, während nur eine minimale Knochenbildung mit faserigen Verbindungen in der Kontrollgruppe vorhanden ist.

### 2.2. Knochenbildung

Knochen übernehmen im Körper vielfältige Funktionen. Sie bilden das Skelett, sind Ansatzstellen für Skelettmuskeln, bilden die knöchernen Grundlagen der Brust- und Beckenhöhle, schließen blutbildende Organe ein und sind Depot für Teile des Mineralstoffhaushaltes des Körpers. Jedoch ist Knochen entgegen der verbreiteten Meinung eine sehr dynamische Struktur die einem ständigen Umbau unterliegt. Dieser Umbau ermöglicht es dem Knochen sich nach einer Fraktur selbst zu reparieren und sich den Kräften die auf ihn wirken anzupassen (Datta et al. 2008). Das Baumaterial für den Bewegungsapparat entstammt dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, aus dem sich Ursegmente und Sklerotome mit Skelettbildungszellen entwickeln und der Anlage des Skeletts dienen (Nickel et al. 2003). Die im Knochen vorherrschenden Zellen sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Knochengewebe tritt als Geflecht- oder Faserknochen und als Lamellenknochen auf. Die Knochenbildung erfolgt auf zweierlei Art, spricht man von einer desmalen bzw. primären oder direkten Ossifikation, so entsteht Knochengewebe direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe ohne knorpelige Zwischenstufen. Die Knochenbildung führt zu Entstehung des Bindegewebeknochens z.B. auch in der Knochenbruchheilung. Wird zuerst ein Knorpelmodell gebildet, dieses schrittweise abgebaut und durch Knochengewebe ersetzt, wird diese Art der Knochenbildung chondrale bzw. sekundäre oder indirekte Ossifikation genannt. Während der weiteren Entwicklung des Knochens wird der entstehende „unreife“ Geflechtknochen wieder abgebaut und durch einen „reifen“ Lamellenknochen ersetzt (Liebich et al. 2003). Während der desmalen Ossifikation wandeln sich pluripotente mesenchymale Stammzellen in die sogenannten Osteoprogenitorzellen um, welche nicht mehr zur Selbsterneuerung fähig sind und deren Differenzierungspotential nur noch die Bildung von Knochen-, Knorpel-, und Fettzellen erlaubt. Aus ihnen entstehen über die Zwischenstufe der Präosteoblasten die Osteoblasten (Long 2001). Diese produzieren Kollagenfasern Typ 1, nichtkollagene Proteine und Glykosaminoglykane bzw. Proteoglykane (Osteoid) (Raggatt und Partridge 2010). Osteoblasten mauern sich durch die fortlaufende Synthese einer unverkalkten Knochenmatrix schrittweise ein und distanzieren sich

## 2. Literaturübersicht

---

voneinander, bleiben jedoch durch ihre Zellfortsätze in Kontakt. Allmählich erfolgt die Mineralisierung der Knochengrundsubstanz, aus Osteoblasten werden Osteozyten (Datta et al. 2008). Die Osteozyten befinden sich in Knochenzellhöhlen, wo sie von Ossein umgeben sind. Die Knochenmatrix schließt weitgehend ungeordnete Kollagenfasern ein. Der Beginn der desmalen Ossifikation ist stark verbunden mit der Einsprossung von Blutkapillaren in das Bindegewebe, da die Gefäße zusätzliches mesenchymales Bindegewebe mit sich führen. So kann das Knochengewebe frühzeitig stoffwechselaktive Aufgaben übernehmen (Liebich et al. 2003). Der hyaline Knorpel dient während der chondralen Ossifikation in erster Linie als Platzhalter und Leitstruktur. Gleichzeitig ist der hyaline Knorpel Grundlage für das Längenwachstum des Knochens. Diese Funktion wird erst mit dem Schluss der Epiphysenfuge beendet (Schnorr und Kressin 2006). Man unterscheidet während der chondralen Knochenbildung eine perichondrale und eine enchondrale Ossifikation (Liebich et al. 2003). Die perichondrale Ossifikation läuft ähnlich der desmalen Knochenbildung ab. Dabei wandeln sich Chondroblasten des Knorpelmantels (Perichondrium) unmittelbar in Osteoblasten um. In der Mitte der späteren Diaphyse des Röhrenknochens beginnt die Transformation von Bindegewebe in osteogenes Gewebe (Knochenmanschette). Das Periost entwickelt sich aus dem Perichondrium, die Verknöcherung der Diaphyse setzt sich in Richtung Epiphyse fort (Hartmann et al. 2009). Diese knöcherne Ummantelung beeinflusst nachhaltig negativ den Stoffwechsel des umschlossenen hyalinen Knorpels und der zugehörigen Chondrozyten. In Folge verkalkt die Knorpelmatrix durch hypertrophieren und degenerieren der Chondrozyten. Gleichzeitig sprossen durch die Knochenmanschette Gefäße in den Knorpel, welche Chondroklasten in die verkalkte Zone bringen und den Knorpel auflösen. In den entstandenen Freiraum dringen Blutkapillaren und Bindegewebe. Der vormals vorhandene Knorpel wird vollständig abgebaut, es beginnt die enchondrale Ossifikation (Verknöcherung) (Schiebler und Korf 2007). Unter ständigem Auf- und Abbau von Knochengewebe entwickelt sich die primäre Markhöhle. Diese wird in zunehmendem Maß durch die Umwandlung des Bindegewebes in hämaretikuläres Gewebe zum sekundären Mark (rotes Knochenmark). Schon sehr früh werden nun die Chondrozyten durch die periphere Knochenmanschette gezwungen, sich säulenartig anzuordnen. Unter gleichzeitiger mitotischer Vermehrung der Chondrozyten tritt ein Längenwachstum des Knorpels und damit des späteren Knochens ein (Liebich et al. 2003). Die Vorgänge des enchondralen Umbaus des Knorpelgewebes, seines allmählichen Abbaus und der Neubildung von Knochengewebe aus mesenchymalem Bindegewebe sind besonders an den Epiphysenplatten (Metaphysen) zwischen der Diaphyse und

der Epiphyse eines Röhrenknochens sichtbar. Hier lassen sich verschiedene Zonen voneinander trennen. In der Reservezone liegen Chondrozyten in charakteristischer Anordnung vor, diese Chondrozyten beginnen sich vermehrt in der Proliferationszone in Richtung Markhöhle zu teilen und ordnen sich zu Säulen in der Säulenknorpelzone an. Anschließend vergrößern sich in der Blasenknorpelzone die Chondrozyten. Die Kalzifizierung der Knorpelmatrix wird in der Verknöcherungszone abgeschlossen. Der Abbau der Chondrozyten durch Chondroklasten setzt sich in der Eröffnungszone fort (Schnorr und Kressin 2006). Durch Gefäße gelangen Osteoblasten in die erweiterten Hohlräume des Knochens und legen sich noch nicht verkalkten Knorpelresten an. Die Neubildung von Knochengrundsubstanz setzt ein. Der primär gebildete Geflechtknochen wird allmählich durch den definitiven Lamellenknochen ersetzt (Liebich et al. 2003). Die großen, unregelmäßig geformten, mehrkernigen Zellen, die sich auf der Oberfläche der mineralisierten Matrix befinden, nennt man Osteoklasten. Diese Riesenzellen zersetzen die Knochengrundsubstanz durch ihre proteolytischen Enzyme. Der Gesamtprozess der Knochenentwicklung unterliegt einer fein abgestimmten hormonalen Kontrolle. Dabei entfalten Calcitonin (Hemmung der Osteoklastentätigkeit), Parathormon und 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol (Stimulierung der Osteoklasten) ihre Wirkung (Weyrauch et al. 1998).

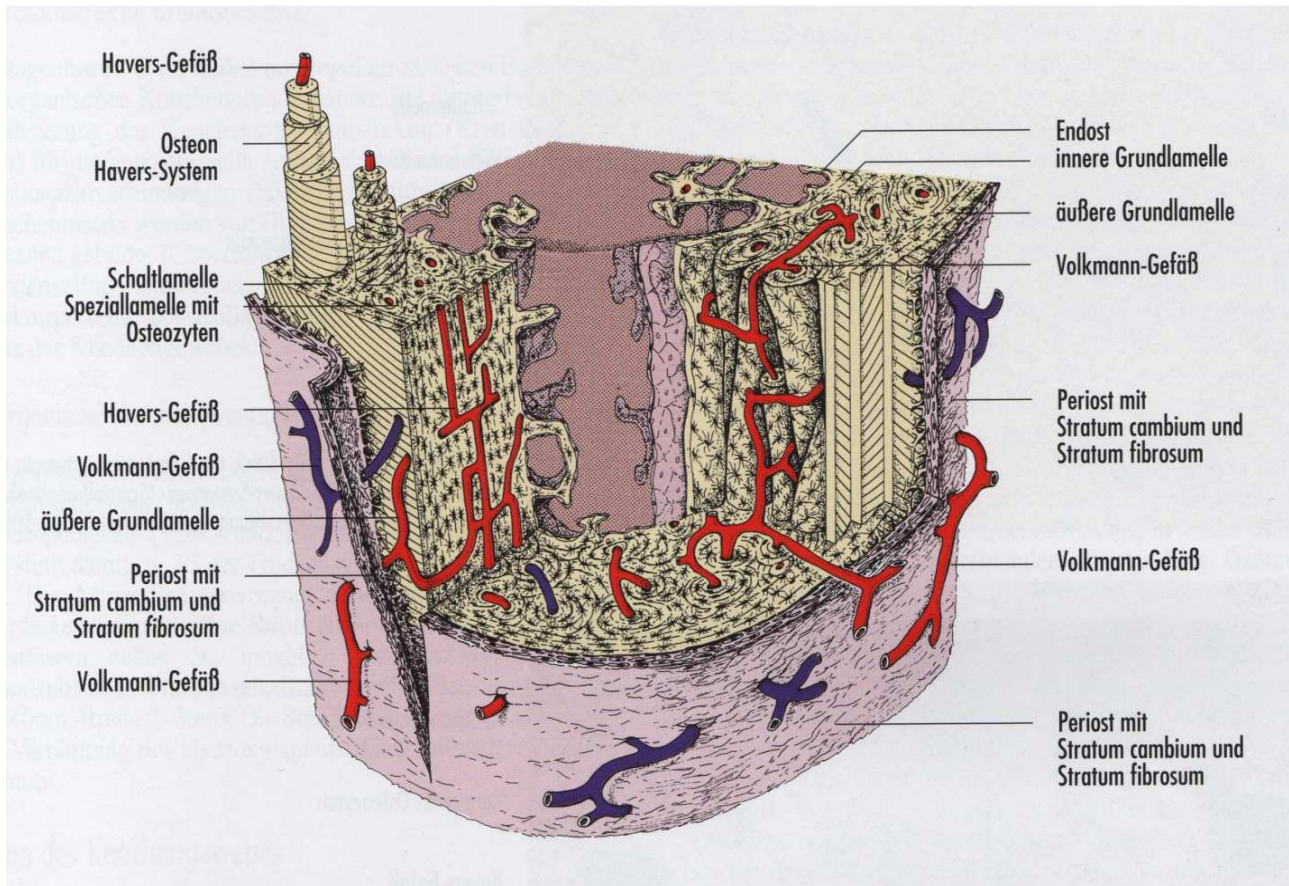
### 2.3. Knochenaufbau

Rein deskriptiv lassen sich lange Röhrenknochen, platte und breite Knochen, kurze Knochen und Sesambeine unterscheiden. Der fertig entwickelte Knochen besteht zu einem Drittel aus organischer Grundsubstanz, dies sind zu 90% Kollagenfasern Typ 1, und zu zwei Drittel aus anorganischem Material, in dem Kalziumphosphat mit 85%, Kalziumkarbonat mit 10%, Magnesiumphosphat mit 1,5% und Kalziumfluorid mit 0,3% vertreten sind (Liebich et al. 2003). Diese Mineralien liegen als kristalline Raumgitter (Hydroxylapatit) Kollagenfasern außen an, umgeben von proteoglykanreicher Grundsubstanz (Raggatt und Partridge 2010). In der Histologie unterscheidet man Geflechtknochen oder Faserknochen von Lamellenknochen. Beide weisen qualitativ die gleiche, zelluläre, kollagenfaserige und mineralisierte Zusammensetzung auf, sie unterscheiden sich lediglich in der Quantität dieser Bestandteile. Der Geflechtknochen ist zellreich und die Osteozytenverteilung ist in der knöchernen Matrix ungeordnet. Ein unregelmäßig geformtes Geflecht aus fein- und grobfibrilläre Kollagenfaserbündeln durchzieht die geformte Grundsubstanz. Der Geflechtknochen schließt weniger anorganische Substanzen ein (Hartmann et al. 2009). Der durch die parallel oder konzentrisch angeordneten Kollagenfasern gekennzeichnete Faserknochen wird während der embryonalen Entwicklung angelegt und nach der Geburt rasch durch Lamellenknochen ersetzt. Die

## 2. Literaturübersicht

---

strukturelle Grundlage des Lamellenknochens ist das Osteon (Havers-System), das aus Zentralkanal (Havers-Kanal), gefüllt mit mesenchymalem Bindegewebe einem Gefäß und vegetativen Nerven gebildet wird, sowie einer unterschiedlichen Anzahl konzentrischer Knochenlamellen, die von Kollagenfasern und mineralisierter Knochenmatrix gebildet werden. Osteozyten liegen in regelmäßiger Anordnung stets zwischen den konzentrisch geschichteten Lamellen um den Zentralkanal. Die starke Vaskularisierung des Knochens ist nicht zuletzt auf die Volkmann-Kanäle zurückzuführen, über die die Haversgefäße miteinander in Verbindung stehen. Der Knochen wird so zu einem stark vaskularisierten Gewebe (Rohen und Lütjen-Drecoll 2000). Das Mittelstück des Knochens wird von dem die Markhöhle umschließenden starken Knochenmantel (Substantia compacta) gebildet, während die Knochenenden von einer dünnen kompakten Knochenrinde (Substantia corticalis) überzogen sind unter der eine an einen feinporigen Schwamm erinnernde, aus feinen, makroskopisch sichtbaren Bauelementen zusammengesetzte Schwammsubstanz (Substantia spongiosa) liegt. Das Periost ist durch Sharpey-Fasern mit dem Knochen verbunden und enthält zu- und abführende Versorgungsbahnen und der Regeneration des Knochengewebes dienende Ruhestadien entsprechend potente Bindegewebezellen (Abbildung 1). Für die Blutgefäßversorgung kommen das medulläre, das epiphysäre und das apophysäre sowie das periostale Blutgefäßsystem in Betracht (Liebich et al. 2003; Nickel et al. 2003).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens. Quelle: Liebich (2003). "Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis." 4. Auflage Schattauer Verlag, S. 93.

### 2.4. Frakturklassifikation

Frakturen gliedern sich anhand ihrer Ätiologie in traumatische (Einwirkung äußerer Kräfte), pathologische Frakturen (z.B. hervorgerufen durch Knochentumore oder Osteomyelitis) und Stressfrakturen, bei durch Mikrotraumen vorgeschädigten Knochen. Bei der Lokalisation einer Fraktur wird der betroffene Bereich (Diaphyse, Metaphyse, Epiphysenfuge, Epiphyse, Apophyse) beschrieben. Bei Gelenkbeteiligung wird die Fraktur als artikulär bezeichnet (Hecht 2008). Weiterhin sind komplette Frakturen durch vollständigen Verlust der Kontinuität eines Knochens gekennzeichnet, während bei inkompletten Frakturen ein Teil des Knochens sowie das bedeckte Periost intakt bleiben. Geschlossene Frakturen sind von Weichteilgewebe bzw. Haut bedeckt und vor Infektionen geschützt, wohingegen es bei offenen Frakturen (Grad 1-4) zu Kontakt mit der Außenwelt kommt (Breusch 2009). Frakturen können auf Grundlage der Anzahl der

Frakturfragmente und Verlauf der Frakturlinien unterteilt werden (Hecht 2008). Hierbei werden einfache Frakturen als Transversal-, Schräg-, oder Spiralfrakturen von komplexen Frakturen wie Trümmer- oder Splitterfrakturen bzw. Stückfrakturen mit mehr als zwei Bruchstücken unterschieden. Zusätzlich werden Abrissfrakturen als Resultat von Sehnenabrissen und Stauchungs- oder Kompressionsfrakturen nach kompressiver Gewalteinwirkung unterschieden (Hecht 2008).

### 2.5. Frakturheilung

Voraussetzung für eine komplikationslose Frakturheilung sind die Ruhigstellung der Fraktur, ein enger Kontakt der Fragmente und eine ausreichende Durchblutung und Weichteilabdeckung (Berchtold 2008). Werden diese Bedingungen etwa durch eine stabile Osteosynthese ideal erfüllt, so heilt die Fraktur direkt bzw. primär, d.h. ohne den Umweg über ein narbiges Zwischengewebe (Kallus) (Horch 2006). Wird eine Fraktur der Spontanheilung überlassen oder sind eine oder mehrere der oben genannten Voraussetzungen nicht oder nur unvollständig gegeben, bildet sich zwischen den Fragmenten und um sie herum überschüssig Kallusgewebe, welches dann allmählich zu Knochengewebe differenziert wird, somit heilt die Fraktur indirekt bzw. sekundär (Berchtold 2008). Bei der direkten Frakturheilung unterscheidet man die Kontaktheilung von der Spaltheilung (Grünbaum und Schimke 2006). Ist die Fraktur durch eine Osteosynthese in anatomischer Stellung, ohne Distanz im Frakturspalt sicher fixiert, so kommt es zur Kontaktheilung. Osteoblasten- und Osteoklastentätigkeit laufen parallel ab, so dass keine Resorptionsräume entstehen. Neu gebildete Osteone wachsen über den Frakturspalt in die gegenseitige Kortikalis ein (Krämer et al. 2007). Ist der Frakturspalt, bei stabiler Osteosynthese, nicht vollständig geschlossen, so kommt es zur sogenannten Spaltheilung. Hier wird der verbliebene Spalt vom Periost und Endost zunächst mit Geflechtknochen aufgefüllt und dann sekundär in lamellären Knochen umgewandelt, der dann in kortikalen Knochen mit Havers'schen System umgebaut wird. Auch hier ist kein äußerer Kallus sichtbar (Krämer et al. 2007). Eine Spaltheilung tritt bei stabiler Osteosynthese bis zu einer Spaltbreite von 0,8 mm auf. Die sekundäre Knochenheilung zeichnet sich durch drei Phasen aus. Es kommt nach der im Frakturbereich entstehenden Blutung zur Entzündungsphase, Immigration und Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen und zur Granulationsgewebekonstruktion. In der Reparationsphase verbinden Binde- und/oder Knorpelgewebe (als Kallus) zunächst die Fragmentenden und nekrotischer Knochen wird resorbiert. Der Knorpel mineralisiert und wird dann durch Knochengewebe ersetzt. Es schließt sich die knöcherne Konsolidierung und die Remodellingphase, entsprechend der Belastung des Knochens an (Kramer 2004).



### 2.6. Frakturheilungsstörungen

Zahlreiche Faktoren können Einfluss auf den Heilungsprozess nehmen. Das Alter des Patienten ist ausschlaggebend für die Dauer einer Frakturheilung (Schmit-Neuerburg 2001). Während eine unkomplizierte diaphysäre Fraktur bei einem sehr jungen Patienten in wenigen Wochen klinisch geheilt sein kann, kann der Heilungsprozess bei einem älteren Patienten mehrere Monate in Anspruch nehmen (Hecht 2008). Weiterhin spielt die Lokalisation der Fraktur und die Apposition der Frakturfragmente eine Rolle, d.h. Trümmerfrakturen bzw. komplizierte dislozierte Frakturen haben eine schlechtere Heilungstendenz (Hecht 2008). Jegliche Beeinträchtigung der vaskulären Versorgung des betroffenen Knochens z.B. Weichteiltraumen, Verletzungen des Periosts oder chirurgische Implantate können die Frakturheilung behindern. Instabilität resultiert in verzögerter oder sogar ausbleibender Frakturheilung. Betroffene Patienten zeigen oft überschießende Kallusbildung im Frakturbereich, jedoch ohne Tendenz zur Überbrückung des Frakturspalt. Häufig sind Mobilität im Frakturbereich und Implantatlockerung miteinander vergesellschaftet (Hecht 2008). Bei offenen Frakturen und bei Osteomyelitis ist die Frakturheilung signifikant beeinträchtigt. Pathologische Frakturen haben eine schlechte oder gar keine Heilungstendenz, je nach zugrunde liegender Knochenerkrankung. Manche von der Fraktur unabhängige Erkrankungen und Medikamente wie z.B. Kortikosteroide, können den Heilungsprozess ebenfalls negativ beeinflussen (Hecht 2008). Ist eine Konsolidierung des kortikalen Knochens für eine physiologische Belastung nach 20-24 Wochen nicht erkennbar, spricht man von einer verzögerten Heilung oder delayed Union. Ursachen dieser verzögerten Heilung können eine zu starke Fixation, eine Osteomyelitis, ein Hyperparathyreoidismus oder Kortikosteroide sein (Berchtold 2008). Ist eine Fraktur auch nach Ablauf von 8 Monaten nicht verheilt, so liegt nach allgemeiner Übereinkunft eine Pseudarthrose oder Nonunion vor (Grifka und Kuster 2011). Unter dem Begriff Pseudarthrose versteht man im engeren Sinne eine falsche Gelenkbildung oder die fehlende Kallusbildung über 8 Monate hinaus. Mögliche Ursachen können eine starke Dislokation, die Interposition von Weichteilen in den Frakturspalt, eine hochgradige Distraction, eine mangelhafte Ruhigstellung oder eine fehlende Kallusbildung sein (Berchtold 2008). Unterschieden werden diese Pseudarthrosen, basierend auf der röntgenologisch nachgewiesenen Menge an Kallus in eine hypertrophe Form mit einem hochgradig ausgebildeten periostalen Kallus (Elefantenfuß), eine oligotrophe Pseudarthrose mit einer geringen Kallusbildung und eine atrophe Form ohne Kallusbildung (Krämer et al. 2007). Bei einer Fehlheilung bzw. Malunion kann die korrekte anatomische Ausrichtung des Knochens nicht erreicht bzw. aufrechterhalten werden (Fossum 2008).

### 2.7. Knochenersatz: Forschungsstand

Die Frakturheilung ist ein biologischer Prozess, der nach einem Knorpel- und Knochenschaden den Gewebezusammenhang für die Funktionalität wiederherstellt. Primäre Erwartung des betroffenen Patienten sind die Korrektur und Wiederherstellung der gestörten Funktion. Es gibt unterschiedliche Maßnahmen, die zu einer adäquaten Frakturheilung führen. Die konservative Behandlung, kann je nach Frakturtyp eine vollwertige Frakturversorgung darstellen. Demgegenüber steht die Osteosynthese z.B. mittels Platten, Marknagel, Fixateur externe oder Verriegelungsnagel und die Osteosynthese unter Zuhilfenahme von Knochenersatzstoffen. Knochenersatzstoffe können nach Implantation strukturelle Elemente oder deren Teilfunktion ersetzen und sollen allein oder zusammen mit anderen Substanzen den Knochenheilungsprozess fördern (Rueger et al. 2010). Weil Ersatzmaterialien nach der Implantation eine Reaktion des Körpers hervorrufen, sind sie streng genommen alle bioaktiv. Während eine entzündliche Immunantwort nicht gewünscht ist, sollen Knochenersatzmaterialien die Knochenneubildung unterstützen (Schieker et al. 2008). Man unterscheidet osteogenetische, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften der Ersatzstoffe (Rueger et al. 2010). Dabei sind osteogenetische Materialien solche, die lebende Zellen beinhalten, welche zu Knochen differenzieren können. Osteoinduktive Substanzen stimulieren lokale oder applizierte Zellen zur Osteoblastendifferenzierung und somit zur Knochenneubildung. Osteokonduktive Knochenersatzmaterialien dienen als Leitstruktur, wobei der neu gebildete Knochen an der Oberfläche der Ersatzmaterialien entsteht (Schieker et al. 2008). Von Knochentransplantaten und -ersatzstoffen wird eine Vielzahl von Funktionen erwartet, welche gegenwärtig noch von keinem synthetischen Material befriedigend erfüllt werden kann. Die Ziele, die mit Biomaterialien für den Knochenersatz erreicht werden sollen, gehen über den einfachen Ersatz des körpereigenen Gewebes durch ein künstliches Implantat hinaus. Es wird angestrebt, die Knochenheilung in Bezug auf die Menge des neugebildeten Knochens, die Qualität des neugebildeten Knochens und die Dauer, positiv zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen (Rueger 1998). Gleichzeitig soll ein mechanisch gut belastbares Implantat entwickelt werden (Büchter et al. 2004). Sollte es gelingen, die knöcherne RepARATION bereits in Bezug auf die beiden ersten Punkte zu fördern, so könnte dies zu einer Verbesserung der Knochenmasse und deren Reife am Defektort führen und würde den individuellen Heilungsablauf günstig beeinflussen. Eine Beschleunigung der Knochenheilung durch ein Knochenersatzmaterial hätte neben der individuellen eine große volkswirtschaftliche Bedeutung, da es in der Folge zu einer deutlichen Reduktion der Behandlungskosten während der stationären und ambulanten Therapie kommen würde. Die

## 2. Literaturübersicht

---

Entwicklung eines belastbaren Implantats würde das operative und technische Vorgehen deutlich erleichtern (Rueger 1998). Schließlich sollte langfristig ein Umbau des Transplantats bzw. Implantats (Remodelling) erfolgen. Menschlicher Knochen unterliegt einem ständigen Umbau, der unter physiologischen Bedingungen zu einem vollständigen „turn-over“ innerhalb von 3–6 Monaten (spongioser Knochen) bzw. 6–12 Monaten (kortikaler Knochen) führt. Das optimale Knochentransplantat sollte in diesen Prozess mit einbezogen werden, ohne in dieser Zeit seine mechanische Integrität zu verlieren (Hutmacher et al. 2007). Voraussetzung für den anzustrebenden Knochenaufbau ist also bei Erhaltung der Stabilität, die Resorption des Aufbaumaterials simultan zur körpereigenen Knochenneubildung (Horch und Pautke 2006). Zur Erlangung der Osteokonduktion sollte das Knochentransplantat bzw. Knochenersatzmaterial eine poröse Struktur aufweisen, die sowohl osteoblastären als auch osteoklastären Zellen eine Migration aus dem Knochenlager ins Transplantat erlaubt, hierfür werden Porengrößen von 150–600 µm angegeben, welche damit trabekulären Strukturen nahe kommen (Stiehler et al. 2009). 2,2 Millionen Knochenersatztransplantationen werden jährlich weltweit durchgeführt, um Knochendefekte in der Orthopädie, Neurochirurgie und Zahnheilkunde zu versorgen (Lewandrowski et al. 2000). Die Behandlung großer Knochendefekte stellt seit über hundert Jahren eine Herausforderung für den orthopädischen und traumatologisch tätigen Chirurgen dar. Der Gebrauch von Knochenersatzstoffen kann in verschiedenen chirurgischen Disziplinen einschließlich der Chirurgie des Kopfes, der Zahnheilkunde und der langen Röhrenknochen angezeigt sein. Für den klinischen Erfolg bei der Anwendung von Knochentransplantaten bzw. -ersatzstoffen sind neben der biologischen Wertigkeit des Materials selbst die primär erreichbare Stabilität und auch die Vitalität des Knochenlagers von großer Bedeutung (Bernstein et al. 2009). Der Gebrauch von Knochenersatzmaterialien in der Veterinärchirurgie ist derzeit noch gering, aber aufgrund von großen Erfolgen in der Humanmedizin ist mit ähnlich neuen chirurgischen Techniken für die Veterinärchirurgie in naher Zukunft zu rechnen. Angeborene Knochendefekte wie Gaumenspalten werden sowohl bei Menschen wie auch beim Tier gefunden. Knochenersatzstoffe spielen eine wichtige Rolle in der Spaltreparatur (Tollefson et al. 2008). Die Rekonstruktion von erworbenen oder angeborenen großen Knochendefekten im Mund-, Kiefer-, und Gesichtsbereich ist ein weiteres Einsatzgebiet für Knochenersatzstoffe. Trotz des beträchtlichen Fortschritts, welcher im Bereich der Knochenregeneration gemacht worden ist, sind diese Knochendefekte eine chirurgische Herausforderung (Vertenten et al. 2010). Der Einsatz von Knochenaufbaumaterialien ist dagegen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wesentlich verbreiteter als in anderen Fachgebieten. Im

## 2. Literaturübersicht

---

Hinblick auf die verwendete Menge pro Patient ist der Verbrauch aber deutlich geringer. Dabei ist die zukünftige Entwicklung von der allein prothetischen hin zur implantatgestützten Zahnversorgung zu beachten. In der Bundesrepublik Deutschland gibt es jährlich ca. 14 Millionen Zahnverluste. Zur prothetischen Versorgung von zahnlosen und teilbezahnten Patienten stellen zahnärztliche Implantate heute ein allgemein anerkanntes Therapiemittel dar. Die Anzahl inserierter Implantate in Deutschland stieg von 200.000 im Jahr 2001 auf über 400.000 im Jahr 2003 mit weiter steigender Tendenz (Horch und Pautke 2006). Bedingung für das Setzen eines Implantates ist das Vorhandensein eines ausreichenden Knochenangebotes und für die erfolgreiche Insertion des Implantates die ausreichende Primärstabilität (Koeck und Wagner 1996). Der Gebrauch von Knochenersatzstoffen in der Zahnheilkunde beschränkt sich also nicht nur auf die Reparatur von Knochendefekten, sondern auch auf die Möglichkeit eine knöcherne Grundlage für zukünftige Implantate zu schaffen (Babbush 2001). Ein zahnloser oder teilzahnloser Kiefer ist ebenfalls bei kleinen Haustieren bekannt. Der Verlust von Zähnen und das Altern veranlasst eine Knochenresorption, aus der eine progressive Resorption des Kiefers resultiert. Die Rehabilitation dieses Kiefers mit Zahnimplantaten ist ohne Knochenersatz oft nicht möglich (Bettega et al. 2009). Die Anwendung des Knochenersatzes wird in der Tierzahnheilkunde sowohl für Hunde als auch für Katzen beschrieben, um die alveolare Knochenhöhle zu bewahren oder um eine Kieferstabilität im Anschluss an Zahnextraktionen wieder herzustellen (Marretta 2002; Bellows 2004). Knochenersatzstoffe können verwendet werden, um große Knochendefekte nach Traumen, Korrekturosteotomien, Osteotiden oder Tumorresektion zu überbrücken, um dadurch z.B. die Kontinuität eines Röhrenknochens wieder herzustellen (Slatter 2003). Insbesondere in der Revisionsendoprothetik großer Gelenke (v. a. Hüfte und Knie) ist, bedingt durch die steigende Anzahl primärer Versorgungen, eine zunehmende Problematik zu erwarten. Die Lockerung von Endoprothesen geht insbesondere bei mehrjährigen Verläufen ohne adäquate Kontrollen häufig mit großen knöchernen Defekten einher. In diesen Situationen ist die Verfügbarkeit eines biologisch und mechanisch möglichst hochwertigen Knochentransplantates zur Auffüllung der entstandenen Defekte wünschenswert. Zwei unterschiedliche Probleme müssen jedoch hierbei berücksichtigt werden: zum Einen weisen diese periprothetischen Knochendefekte aufgrund von Fremdkörperreaktionen und der damit einhergehenden Entzündungs- und Destruktionsvorgänge oft eine erhebliche Größe (bis hin zur Beckendiskontinuität) und eine nur sehr eingeschränkte biologische Regenerationsfähigkeit auf. Zum Anderen können weitere ungünstige Faktoren, wie ein hohes Alter der Patienten, begleitende Stoffwechselerkrankungen und die oft nur eingeschränkt

## 2. Literaturübersicht

---

mögliche postoperative Entlastung, die adäquate Einheilung von Transplantaten bzw. Knochenersatzstoffen gefährden (Bernstein et al. 2009). Man unterscheidet bei den Biomaterialien zum Knochenersatz folgende Klassen (Rueger 1998):

1. biologisch organische Substanzen
2. synthetische anorganische Materialien
3. synthetische organische Verbindungen
4. Komposite.

Diese Klassifizierung beruht auf der Tatsache, dass alle biologischen Materialien für den Knochenersatz erstmalig aus der organischen Phase des Knochengewebes gewonnen werden, wogegen die synthetischen, anorganischen Knochenersatzmittel aus der anorganischen Phase des Knochens gewonnen werden. In der Klasse der synthetisch organischen Verbindungen werden organische Polymere und deren Kombinationen zusammengefasst, wogegen in der Klasse 4 alle Komposite, d. h. Mischungen bzw. Kombinationen von Substanzen der Klassen 1, 2 und 3 erfasst werden. Die 1. Klasse lässt sich wie folgt aufgliedern (Rueger 1998): Knochenmatrizes, Knochenmatrixextrakte, extrahierte Knochenwachstumsfaktoren wie z.B. das bovine BMP (Urist et al. 1982) oder Knochenwachstumsfaktoren wie das rh-BMP-2 (Rosen et al. 1989) oder das OP 1 (Lacroix 1945) und chemotaktische Faktoren. Die Klasse der synthetischen, anorganischen Verbindungen wird eingeteilt in monophasische synthetische Verbindungen, hydrothermal aus Korallen bzw. Algen über einen Umwandlungsprozess produzierte Hydroxylapatitkeramiken, aus bovinem Knochen gewonnene Hydroxylapatitkeramiken, mehrphasische Kalziumphosphatkeramiken, Biogläser oder mehrphasische Glaskeramiken und kalziumphosphathaltige Knochenzemente (Schieker et al. 2008). Die Klasse der synthetisch, organischen Verbindungen, sind erst in den letzten Jahren auf ihre Einsatzmöglichkeit als Knochenersatzstoffe überprüft worden, erfordert aufgrund der chemischen Zusammensetzung der in ihr enthaltenen polymeren Verbindungen eine Unterteilung in die Untergruppen Polyester, Polyanhydride, Polyorthoester und Polyphosphazene (Rueger 1998). Eine Aufgliederung der Komposite erscheint nicht möglich. Komposite vereinigen Gerüsteigenschaften mit biologischen Elementen, um die Zellproliferation und Differenzierung zu stimulieren (Rueger 1998). Die meisten anorganischen Knochenersatzmaterialien sind vornehmlich osteokonduktiv. Osteoinduktive Eigenschaften besitzen z.B. die rekombinant hergestellten Wachstumsfaktoren BMP-2 und BMP-7 und in geringem Maß auch manche biologisch, organischen Knochenersatzmaterialien wie demineralisierte Knochenmatrixpräparate. Durch Kombination von osteokonduktiven und

osteoinduktiven Materialien zu Kompositen versucht man verbesserte Materialeigenschaften zu erreichen. In dieser Gruppe sind so unterschiedliche Kombinationen wie Metallspongiosa zusammen mit autologem Knochen bzw. synthetisches Hydroxylapatit in Verbindung mit bovinem Kollagen anzutreffen (Rueger 1998; Schieker et al. 2008).

### 2.7.1. Autologe Knochentransplantate

Unter einem autologen Transplantat versteht man ein Stück körpereigenes Gewebe, welches von einer an eine andere Stelle des Körpers desselben Individuums transplantiert wird. Autologer Knochen ist der Goldstandard des Knochenersatzes (Giannoudis et al. 2005), er wird verwendet um Frakturheilung zu fördern und als strukturelle Stütze in der rekonstruierenden Chirurgie. Die Anzahl der Knochentransplantationen in Deutschland beträgt im Jahr ca. 75.000 (Jerosch et al. 1990). Das autologe Knochentransplantat ist dabei von den absoluten Mengen betrachtet in der Orthopädie und Traumatologie immer noch dominierend. Die Ergebnisse von autologer Knochentransplantation sind berechenbarer als der Gebrauch von allogenen bzw. xenogenen Transplantaten oder synthetischer Knochenersatzstoffe, da autologe Knochentransplantate osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften zur Verfügung stellen und keine immunologischen Reaktionen hervorrufen. Daher werden sie in der Regel komplikationslos in die Defektregion eingebaut. Dennoch besteht die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern von der Spender- auf die Empfängerregion (Rueger et al. 2010). Man unterscheidet spongiöse Knochentransplantate aus der Metaphysenregion mit vielen Knochenbälkchen und lebenden Zellen, von kortikalen Transplantaten aus äußerem kortikalem Knochen mit struktureller Festigkeit. Kortikospongiöse Transplantate bestehen aus beiden Elementen (Slatter 2003). Spongiosa ist wegen ihrer schwammartigen Struktur mit interkonnektiver Porosität osteokonduktiv. Sie fördert das appositionelle Knochenwachstum auf der Oberfläche und bietet dem Transplantatlager ein aufnahmefähiges Gerüst, das eine verstärkte Knochenbildung ermöglicht. Die meisten der transplantierten Zellen sterben oder vollziehen die Apoptose. Die Spongiosa enthält darüber hinaus Knochenmarkanteile mit noch wenig ausdifferenzierten Vorläuferzellen. Diese mit der Spongiosa übertragenen lebenden Zellen besitzen die Fähigkeit, bei entsprechender Stimulation und Differenzierung zu knochenbildenden Zellen auszureifen. Damit hat die Spongiosa eine osteogene Potenz (Horch und Pautke 2006). Im Knochendefekt eingebracht, haben nur die knochenbildenden Zellen eine Überlebenschance, die direkt dem ernährenden Lagerknochen anliegen. Die zentral liegenden Spongiosatransplantatanteile werden verzögert revaskularisiert. Folglich ist die osteogene Potenz des Spongiosatransplantates lokal begrenzt (Merten et al. 2003). Was die funktionelle

Qualität der Regenerate aus reinen Spongiosatransplantaten betrifft, so sind diese kritisch zu bewerten, da sie eine geringe Festigkeit besitzen und starker Resorption unterworfen sind (Horch und Pautke 2006). Die Kompakta besitzt wegen des Fehlens interkonnektierender Porosität nur an der Oberfläche eine Osteokonduktivität. Lediglich die Volkmann'schen und Havers'schen Kanäle bieten Leitschienen im Innern des sonst porenfreien Knochenmaterials. Im Vergleich zur Spongiosa ist das Verhältnis osteogener Zellen in der Kortikalis mit 1:4 zahlenmäßig nur sehr gering (Merten et al. 2003). Die Mehrzahl der Osteozyten überlebt eine Transplantation nicht (Zerbo et al. 2003), der Knochen wird nekrotisch (Bauer und Muschler 2000). Eine osteogene Potenz besitzt das kortikale Knochentransplantat somit nur in sehr geringem Maße. Es wird zudem nur äußerst langsam revaskularisiert, womit es eine größere Anfälligkeit gegenüber Infektionen aufweist. Während der Knochenaufbauphase ist die biomechanische Festigkeit des kortikalen und spongiösen Knochens unterschiedlich. Spongiöse Transplantate gewinnen zunächst an Stabilität infolge der Osteokonduktivität, wohingegen Kortikalistransplantate im Laufe der Resorptionsvorgänge an Stabilität verlieren (Burchardt 1983). Aufgrund dieser Eigenschaften werden daher meist keine reinen kortikalen, sondern vielmehr kortikospongiöse Knochentransplantate verwendet. Durch die Untersuchungen von Urist (1997) ist bekannt, dass in der Knochenmatrix Proteine mit osteoinduktiven Eigenschaften vorkommen. Besonders die als „*bone morphogenetic proteins*“ (BMP) bezeichneten Faktoren haben einen osteoinduktiven Einfluss, indem sie die Differenzierung unreifer mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten mit nachfolgender Osteogenese fördern (Urist 1997). Obwohl autologer Knochen von Tibia, Fibula, Olecranon, distalem Radius, und Rippen gewonnen werden kann, bleibt der Beckenkamm die am häufigsten gewählte Entnahmestelle, weil dort ein leichter Zugang zu qualitativ und quantitativ guter Knochenspongiosa bei moderater Entnahmemorbidität besteht (Friedlaender 1987; Goldberg und Stevenson 1987). Kleinere Komplikationen für die Entnahmestelle sind oberflächliche Infektionen, kleinere Serome und Hämatome. Größere Komplikationen für die Spenderregion bestehen in eventuell auftretenden Eingeweideherniationen, Verletzungen des Harntraktes, instabilem Becken, Gefäßverletzungen und starkem Blutverlust, tiefen Infektionen, Nervenläsionen sowie tiefen Hämatombildungen (Arrington et al. 1996). Dies kann erneute chirurgische Eingriffe nötig machen und in der Folge auch zu Frakturen in der Entnahmeregion führen (Arrington et al. 1996). Darüber hinaus kommt es natürlich immer zu Wundschmerzen (Prolo und Rodrigo 1985). Es besteht die Gefahr, dass zelluläre (osteogene) Elemente die Transplantation nicht überleben (Sandhu et al. 1999). Eine Beschränkung erfährt die autologe Knochentransplantation bei der

Entnahme von großen Transplantaten vor allen bei pädiatrischen oder alten Patienten, Schwerverletzten und Patienten in schlechtem Allgemeinzustand (Giannoudis et al. 2005).

### 2.7.2. Allogene Knochentransplantate

Als allogenes Transplantat bezeichnet man Gewebe, das einem anderen Individuum derselben Spezies eingepflanzt wird (Slatter 2003). Allogener Knochen ist eines der am häufigsten gewählten Knochentransplantate und wird als die zweite Wahl des Chirurgen nach autologem Knochen betrachtet (Carter 1999). Wenn große Defekte aufzufüllen und zu überbrücken sind, stößt der autologe Knochenersatz aufgrund seiner Verfügbarkeit an seine Grenzen. Aus diesem Grund werden in den meisten größeren unfallchirurgischen und orthopädischen Kliniken eigene Knochenbanken betrieben. In Deutschland werden jährlich 25.000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt (Jerosch et al. 1990). Allogene Knochentransplantate sind in vielen Formen verfügbar: demineralisierte Knochenmatrix, gemörserte Spongiosa, Spongiosachips, kortikale oder kortikospongiöse Transplantate und ganze Knochensegmente (Finkemeier 2002). Bei den Transplantaten handelt es sich überwiegend um Hüftköpfe, welche beim endoprothetischen Gelenkersatz anfallen und in geringem Umfang um Knochen, der von Organ- und Gewebespendern gewonnen wird (v. Garrel und Gotzen 1998). Im Vergleich zu künstlichen Knochenersatzmaterialien wie Knochenzement und Hydroxylapatitkeramiken liegt der wesentliche Vorteil allogener Knochentransplantate in deren Fähigkeit, osteokonduktiv und in geringem Umfang osteoinduktiv zu wirken. Frische Transplantate werden selten verwendet, da sie ein zu hohes Risiko für Immunreaktionen bzw. Krankheitsübertragungen beim Empfänger besitzen (Friedlaender et al. 1999), daher setzt die Verwendung von allogenen Knochentransplantaten bestimmte Konservierungstechniken, Spender-Screening-Verfahren und Sterilisationsverfahren voraus (Endres et al. 2005). Momentan finden zur Inaktivierung von Bakterien, Pilzsporen und Viren unterschiedliche Verfahren Anwendung. Unabhängig, ob eine physikalische Sterilisation durch Gammabestrahlung (Endres und Kratz 2009), eine chemische Behandlung mit Peressigsäure/Ethanol (Wutzler und Sauerbrei 2000) oder ein Thermoverfahren (Hofmann et al. 1996) zur Sterilisation der Knochentransplantate angewendet wird, ist mit jedem Verfahren eine maximale Keim- und Virusinaktivierung zu erreichen und die Gefahr von Immunreaktionen zu vermindern (Endres et al. 2005). Belegt ist der negative Einfluss der verschiedenen Sterilisations- und Desinfektionsverfahren auf die Vitalität der Zellen und Wachstumsfaktoren (Hallfeldt et al. 1995), die Brüchigkeit der Implantate und ihre Resorptionseigenschaften (Laurencin et al. 2006). Daher sind ausbleibende Knochenheilung zwischen Transplantat und Empfängerknochen,



Knochenresorption und Frakturen des Transplantats mögliche Komplikationen (De Boer 1988). Die gebräuchlichste Konservierungstechnik von allogenem Knochen stellt die Tiefkühlagerung bei Temperaturen zwischen -30 bis -80 °C dar. Im Gegensatz zum autologen Spongiosatransplantat, in dem die Osteoblasten z.T. überleben und im Wirtslager selbst neuen Knochen bilden, geht vom tiefgefrorenen, allogenem Knochentransplantat keine zelluläre Knochenbildung aus. Die Tiefkühlung bewirkt einen nahezu vollständigen Zelltod. Überlebende Osteoblasten gehen bei der vaskulären Aufschlüsselung des Transplantats aufgrund immunologischer Reaktionen zugrunde (v. Garrel und Gotzen 1998). Mit der zunehmenden Verbreitung der allogen Knochentransplantation rücken auch die damit verbundenen Gefahren für den Transplantatempfänger ins Bewusstsein. Im Vordergrund steht dabei die Übertragung von viralen (Hepatitis Viren, Zytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus, HIV, Parvovirus, Rabiesvirus) und bakteriellen (Staphylokokken und Streptokokken) Krankheitserregern sowie Prionen (Creutzfeldt-Jacob-Agen) und Parasiten (Treponem apallidum, Trypanosomen, Malariaplasmodien, Mikrofilarien, Babesia microti) (James 1953; Martinez und Marcos 1992; Simonds et al. 1992; v. Garrel und Gotzen 1998). Bei der Osteosynthese von Frakturen dient allogener Knochen zur Auffüllung und Überbrückung von Defekten, zur Anlagerung an Fragmente sowie zur Unterfütterung und Abstützung angehobener Gelenkflächen (Tomford 2000). Hüftkopfttransplantate eignen sich besonders gut für additive Korrekturen von Fehlstellungen. Sie lassen sich in Größe und Form passgerecht zuschneiden und ergeben eine solide Abstützung (v. Garrel und Gotzen 1998). Vielseitig einsetzbar sind allogene Knochentransplantate bei Fusionsoperationen an der Wirbelsäule. Insbesondere bei erforderlicher Korporektomie resultieren lange Defektstrecken, die nur schwer mit autologem Knochenmaterial zu überbrücken sind (v. Garrel und Gotzen 1998). In der Endoprothetik ist die allogene Knochentransplantation ebenfalls unverzichtbar. Bei Wechseloperationen am Hüft- und Kniegelenk liegen oftmals ausgedehnte Defektsituationen vor, zu deren Auffüllung autologes Knochenmaterial nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht (v. Garrel und Gotzen 1998). Bei Resektion von primären Knochentumoren werden allogene Massivtransplantate zur Defektüberbrückung und Kontinuitätswiederherstellung herangezogen (Tomford 2000). Zur Gelenkrekonstruktion werden osteoartikuläre Transplantate verwendet (v. Garrel und Gotzen 1998).

### 2.7.3. Xenogene Knochentransplantate

Beim xenogenen Knochentransplantat sind Spender und Empfänger Individuen unterschiedlicher Spezies. Diese Transplantate sind natürliche Materialien, die in ihren chemisch-physischen Eigenschaften denjenigen des menschlichen Knochens sehr ähnlich sind und daher in der Regel

osteokonduktive Eigenschaften aufweisen (Simion und Fontana 2004). Xenotransplantate werden zurzeit aus unterschiedlichsten Spezies gewonnen. Neben Korallen (Hauschild und Bader 2004) und Equiden (Winking 2001) dienen vor allem Rinder als Spendertiere (Hauschild und Bader 2004). Xenotransplantate auf boviner Basis haben eine weite Verbreitung in der klinischen Anwendung gefunden (Sogal und Tofe 1999) und sind gut dokumentiert. Sie bestehen überwiegend aus deproteinisiertem spongiösem Knochen und gehören zur Gruppe der Hydroxylapatitkeramiken und damit zu den langsam biodegradierbaren Knochenersatzmaterialien. Das in-vivo-Verhalten dieser Transplantate ist gekennzeichnet durch das völlige Ausbleiben einer Resorption auch nach einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren (Hallman et al. 2001). Knochenwachstum findet ausschließlich in den intergranulären Zwischenräumen der Matrix bzw. in der Matrixperipherie statt. Die Art der knöchernen Integration kann daher als Verbundosteogenese bezeichnet werden (Hallman et al. 2001). Trotz der langsamen bis ausbleibenden Resorption kann durch den Einsatz xenogener knöcherner Transplantate bovinen Ursprungs unter experimentellen und klinischen Bedingungen eine knöcherne Regeneration erreicht werden (Artzi et al. 2001). Der Übergang zwischen Implantatlager und neu gebildeten Knochenstrukturen ist auch 12 Monate nach erfolgter Transplantation noch erkennbar (Artzi et al. 2001). Vor allem im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, aber auch in der Neurochirurgie und in der Orthopädie kommen xenogene Knochenimplantate vermehrt zum Einsatz (Schwartz et al. 2000). Sie stehen dabei in Konkurrenz zu ebenfalls erhältlichen vollsynthetischen Knochenaufbaumaterialien. Laut Herstellern werden im Rahmen des Herstellungsverfahrens xenogener Knochenersatzmaterialien auf boviner Basis sämtliche Proteinstrukturen eliminiert. Verschiedenste Studien können jedoch das Vorhandensein von Proteinstrukturen in diesen Transplantaten nachweisen (Lang et al. 2000) und damit besteht vor allem bei bovinem Transplantatmaterial die Gefahr der Übertragung von Prionen auf den Menschen und die Erkrankung an der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Hauschild und Bader 2004).

### 2.7.4. Biologische Knochenersatzstoffe

Zu den organischen Substanzen werden auch die natürlichen Biopolymere (z.B. Kollagen, Gelatine) gezählt. Diese werden mittels chemischer Aufbereitungsverfahren aus tierischem Ausgangsmaterial (z. B. Rinderhaut) hergestellt. Gelatine ist denaturiertes Kollagen und wird in der klinischen Anwendung weniger verwendet als Kollagen. Biopolymere finden ihre Hauptanwendung z.B. in Form von Schwämmen (Schieker et al. 2008). Typ I Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein in der Extrazellulärmatrix des Knochens. Kollagen trägt zur Mineralablagerung und Vaskularisierung bei, zusätzlich bindet es Wachstumsfaktoren, damit entsteht ein günstiges Umfeld

zur Knochenregeneration (Parikh 2002). Dennoch kann Kollagen Potenzial zur Immunogenität besitzen (Giannoudis et al. 2005). Fleming et al. (2000) berichten über unterschiedliche Ergebnisse, was die primär unterstützende Verwendung für andere osteokonduktive, osteoinduktive oder osteogene Faktoren betrifft. Kollagen ist ungeeignet als alleiniges Transplantat, aber in Verbindung mit BMP, Osteoprogenitorzellen und Stammzellen erhöht es die Transplantatintegration bedeutend. Kollagen wird gewöhnlich zusammen mit anderen Knochenersatzmaterialien (z.B.  $\beta$ -Tricalciumphosphat) verwendet (Giannoudis et al. 2005).

Demineralisierte Knochenmatrix kann durch Dekalzifikation des kortikalen Knochens gewonnen werden. Die Gefahr der Erregerübertragung und immunologischen Reaktionen seitens des Empfängers sind hier stark reduziert. Dieses Material behält weitestgehend seine ursprüngliche Knochenstruktur und kann als ein biologisches osteokonduktives Gerüst für die Knochenregeneration dienen (Ludwig und Boden 1999). Bei der Knochendemineralisation werden nicht alle Wachstumsfaktoren eliminiert, so dass sie im Transplantat noch bioverfügbar sind und geringfügig osteoinduktiv wirken können (Sandhu et al. 1999; Fleming et al. 2000).

Fibrinkleber sind nicht zytotoxisch, vollständig resorbierbare, biologische Matrizen, welche die letzten Stufen der natürlichen Koagulationskaskade durchführen. Der Fibrinkleber enthält Fibrinogen, welches gemischt mit Thrombin, in Fibrinmonomere umgewandelt wird (Le Guéhennec et al. 2004). Der Fibrinkleber wird vom Organismus in der Regel gut toleriert und es sind nur einige wenige Fälle von Nebenwirkungen berichtet worden (Alving et al. 1995). Fibrinkleber werden in der Chirurgie wegen ihrer Eigenschaften als Bindemittel und ihrer hämostatischen Eigenschaften verwendet, aber die Rolle von Fibrinkleber für die Knochenheilung ist umstritten. Albrektsson et al. (1982) berichten über einen negativen Einfluss des Fibrinklebers auf die Knochenheilung. Andere Studien dokumentierten einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration (Bösch et al. 1977; Perka et al. 2000). Die osteoinduktiven Eigenschaften des Fibrinklebers können noch nicht eindeutig demonstriert werden (Le Guéhennec et al. 2004). Fibrinkleber wird in aller Regel zusammen mit anderen Knochenersatzstoffen in Kompositen verwendet oder im Gewebeersatz als Gerüstsubstanz (Ahmed et al. 2008).

### **2.7.5. Synthetische Knochenersatzstoffe**

Es sind beträchtliche Fortschritte in Bezug auf synthetische Alternativen im Knochenersatz innerhalb des letzten Jahrzehnts gemacht worden. Obwohl synthetische Knochenersatzstoffe höchstens nur zwei der vier Eigenschaften eines idealen Knochenersatzmaterials, nämlich Osteointegration und Osteokonduktion besitzen, könnten diese Materialien in naher Zukunft

## 2. Literaturübersicht

---

ähnliche Ergebnisse hervorbringen wie Knochentransplantate und diese teilweise ersetzen (Giannoudis et al. 2005). Als erstes wäre die Gruppe der Kalzium-Phosphatkeramiken zu nennen, in der sich besonders  $\beta$ -Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit (HA) (aus Korallen gewonnen oder synthetisch hergestellt) als Implantatüberzüge oder Knochendefektfüller bewährt haben (Parikh 2002). Kalzium-Phosphatkeramiken finden als osteokonduktive Matrizen in Form von Pulvern, Granulaten oder Blöcken in der Orthopädie und Chirurgie Verwendung. Sie lösen keine Fremdkörperreaktionen aus und werden gut toleriert (Finkemeier 2002). Sie sollten in den intakten Knochen oder den stabilisierten Knochen gelegt werden, um die Keramik vor Zerberstung zu schützen, weiterhin sollten sie dicht an den vitalen Knochen angrenzen, um das Einwachsen der Knochenzellen zu maximieren. TCP hat eine apatite Struktur und ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von 1,5, es gehört wie Hydroxylapatit zu den Hochtemperatur-Calciumphosphaten. TCP findet im gekörnten Zustand oder als Block bzw. Schwamm im Knochenersatz Verwendung (Bohner 2000). TCP ist bioresorbierbar und biokompatibel, aber seine unzulängliche Durchlässigkeit, seine Porosität und sein schneller in vitro Abbau von sechs Wochen machen es zu einem schlechteren Knochenersatz als HA (Parikh 2002). Hydroxylapatit hat eine kristalline Struktur und ist selbst in wässriger Lösung sehr stabil. Die meisten Produkte im Knochenersatz bestehen aus HA aufgrund seiner Stabilität. HA wird im Gegensatz zu TCP innerhalb von Jahrzehnten abgebaut (Bohner 2000). HA ist als dichtes oder poröses Material mit verschiedenen Porengrößen verfügbar (Yoshikawa und Myoui 2005). Neben den Keramiken gibt es auch Calcium-Phosphate in Zementform, welche intraoperativ angefertigt und geformt werden (Moore et al. 2001). Kalzium-Phosphat-Zement ist eine Paste aus anorganischem Kalzium und Phosphat, die in situ hart wird und durch eine Kristallisierungsreaktion ein Hydroxylapatit bildet. Im Vergleich zu autologen Knochentransplantaten und anderen Knochenersatzmaterialien hat Kalzium-Phosphat, wenn gehärtet, eine viel höhere Stabilität und Härte (Hak 2007). Die Poren des Zementes sind zu klein, um ein schnelles Einwachsen des Knochens zu erlauben (Bohner 2000). Im Laufe von Jahren wird der Kalzium-Phosphat-Zement durch Osteoklasten resorbiert, gefolgt von dem Einsproßen kleiner Gefäße, welche von neuem lamellären Knochen bekleidet werden. In vivo Studien der Maus haben gezeigt, dass das Material qualitativ dem Knochenremodelling sehr ähnlich umgebaut wird (Frankenburg et al. 1998). Bei Kalziumsulfat handelt es sich um eine osteokonduktive Matrix für das Einwachsen von Gefäßen und Zellen. Das transplantierte Kalziumsulfat sollte daher neben vitalem Periost oder Endost eingebracht werden (Coetzee 1980). Über eine Zeitdauer von 5-7 Wochen wird das Kalzium-Sulfat aufgelöst. Kalzium-Sulfat neigt in feuchter Umgebung dazu sich

## 2. Literaturübersicht

---

zu erweichen und zu brechen. Aus diesem Grund hat es keine zuverlässigen mechanischen Eigenschaften in vivo, folglich sollte sich der primäre Gebrauch von Kalzium-Sulfaten auf das Gebiet eines Knochenfüllmaterials beschränken (Moore et al. 2001).

Biogläser sind feste und wenig poröse Materialien, welche aus Kalzium, Phosphor, und Silikat bestehen. Abhängig von der Zusammensetzung können resorbierbare und nicht resorbierbare Biogläser hergestellt werden. Sie besitzen sowohl osteointegrative als auch osteokonduktive Eigenschaften. Biogläser zerbrechen leicht beim Bohren oder Biegen, demzufolge sind sie schwierig am Skelett zu befestigen (Giannoudis et al. 2005). Eine äußerst starke Verbindung baut sich zwischen Bioglas und anliegenden Knochenbereichen aufgrund einer siliciumdioxidreichen Gelschicht auf der Oberfläche des Bioglasses aus. Es bilden sich Hydroxylapatitkristalle, welche denen des Knochens sehr ähnlich sind (Gross et al. 1981). Ihr Gebrauch in der granulierten Form als Füllmaterial stellt keinen Vorteil gegenüber anderen vorgebildeten harten Materialien dar, jedoch sind sie im Gegensatz zu Hydroxylapatit resorbierbar. Um ihre Osteointegration zu erhöhen, werden z.B. Metallimplantate mit Bioglas überzogen (Schrooten und Helsen 2000; Moore et al. 2001).

In den letzten Jahren hat man die ursprünglichen Probleme der synthetisch, resorbierbaren Polymerimplantate, wie das Problem der Implantatversorgung, ihre langen Resorptionszeiten und die lange Zeit, welche sie benötigen um sich mit Knochen zu verbinden, durch Variationen im Herstellungsprozess verbessern können (Coombes und Meikle 1994). Synthetische biodegradierbare Polymere haben eine mechanische Primärstabilität, die im Zuge des fortschreitenden Abbaus durch hydrolytische Spaltung abnimmt. Die wichtigsten Grundsubstanzen sind 7 aliphatische Polyester, die durch Polykondensation von Milchsäure bzw. Glykolsäure (Polylaktide bzw. Polyglykolide) hergestellt werden. Beim Abbau entstehen durch hydrolytische Spaltung wieder diese Ausgangssubstanzen, wobei die Polyglykolide schneller abgebaut werden als Polylaktide. Durch Kombination beider Materialien als Copolymere bzw. Kombination mit anderen Materialien, lassen sich die biomechanischen Eigenschaften und die Abbaugeschwindigkeit steuern (Schieker et al. 2008). Resorptionszeiten können von mehreren Wochen bis zu mehr als einem Jahr geändert werden, so dass sie auf die besonderen Anforderungen des Knochengewebes abgestimmt werden können (Coombes und Meikle 1994). Polylaktid- und Polyglykolid-Copolymere finden zusammen mit Biokeramiken (Higashi et al. 1986) und dekalzifiziertem Knochen (Schmitz und Hollinger 1988) als Trägersystem für Knochenwachstumsfaktoren im Knochenersatz Verwendung (Meikle et al. 1993). Sie werden v. a. als Schrauben, Stifte, Platten, Netze, Anker und Markraumstopper eingesetzt. Vor allem aufgrund der lokalen PH-Wert-Senkung durch Freisetzung

von Säuren und des Zerfalls in Mikrokristallite bei der Degradation mit konsekutiven Immun- und Fremdkörperreaktionen, sind diese Polymere bisher als Knochenersatzmaterial in der verbreiteten klinischen Anwendung limitiert (Ignatius et al. 2001).

### 2.7.6. Bone-Tissue-Engineering

*Tissue engineering* ist ein modernes interdisziplinäres Forschungsfeld, in dem Biologen, Materialwissenschaftler und Mediziner gemeinsam daran arbeiten, Gewebe zu ersetzen. Der zentrale Arbeitsansatz sieht vor, einem Patienten Zellen zu entnehmen, diese in vitro zu expandieren und die vervielfachten Zellen auf einer geeigneten Trägersubstanz dreidimensional zu kultivieren. Das so entstandene Zell/Matrix-Konstrukt wird anschließend, eventuell unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, in den zu ersetzenden Gewebedefekt eingebracht. Die Kombination von Biomaterialien und Zellen bildet somit das Fundament, um aus patienteneigenen Zellen dynamische Gewebe als Transplantate zu gewinnen (Niemeyer et al. 2003). Bei der sogenannten „*off-the-shelf*“-Technik, werden Trägermaterialien natürlicher oder synthetischer Herkunft mit allogenen neonatalen Zellen (Fibroblasten, Keratinozyten und mesenchymalen Stammzellen) besiedelt und kultiviert. Anschließend werden diese Biokomposits kryokonserviert, um eine Haltbarkeit von bis zu zwölf Monaten zu erreichen, wobei Studien belegen, dass bis zu 60% der Zellen nach dem Auftauen vital sind (Naughton et al. 1997; Parenteau 1999). Die Technik findet in den letzten Jahren bei mehreren Hautersatzprodukten Anwendung (Hutmacher und Vanscheidt 2002). Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die allogenen Zellen im Vergleich zu autologen transplantierten Zellen, in vivo eine verkürzte Lebensdauer aufweisen. Die zweite Gruppe verfolgt das Ziel, aus autologen Zellen in Kombination mit unterschiedlichen *scaffolds*, Transplantate zu erzeugen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Im Rahmen einer Biopsie unter lokaler Anästhesie werden autologe Zellen entnommen. Nach einer ersten Phase der Zellvermehrung, wird ein resorbierbares Trägergerüst („*scaffold*“) mit Zellen über mehrere Tage bis Wochen kultiviert, um dieses in den jeweiligen Hart- oder Weichgewebedefekt zu transplantieren. Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung jeglicher Abstoßungsreaktionen (Ewers et al. 2003). Ganz allgemein sind zur Neubildung von Gewebe 3 Grundelemente notwendig (Schmidt-Rohlfing et al. 2009):

1. ein strukturelles Gerüst
2. Zellen
3. Wachstumsfaktoren

Dieses sogenannte trianguläre Konzept der Knochenregeneration wird noch um den Faktor der mechanischen Stimulation ergänzt (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Die mechanische Stimulation fördert die Proliferation von Osteoblasten (Wiesmann et al. 2004). Jedes Gewebe besteht aus einer Matrix und einem bzw. üblicherweise mehreren Zelltypen (Salgado et al. 2004). Die Matrix stellt ein 3D-Gerüst für Zellen dar und bietet diesen eine gewebespezifische Umgebung (Kneser et al. 2006). Darüber hinaus dient sie als Reservoir für Wasser, Nährstoffe, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Das Gerüst ist übergangsweise als Umgebung für die Zellproliferation und die Ablagerung extrazellulärer Matrix notwendig (Langer und Vacanti 1993; Laurencin et al. 1999; Hutmacher 2000). Darüber hinaus dient das Gerüst auch zur Vaskularisierung des Neugewebes (Deporter et al. 1988; Murata et al. 1999). Die Materialien können als Schwämme, Gele oder hoch komplexe Strukturen mit Poren und Kanälen in Erscheinung treten (Griffith 2002). Auf die wichtigsten *scaffolds* zur Kultivierung von Knochengewebe wird in den vorherigen Kapiteln eingegangen. Zu ihnen zählen vor allem organische *scaffolds* wie Kollagen oder die anorganischen Materialien wie Hydroxylapatit,  $\beta$ -Tricalciumphosphat, Kalziumsulfat und Bioglas (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). In den letzten Jahren verwendet man immer mehr kombinierte natürliche, synthetisch und resorbierbare Polymere als *scaffold* (Chen et al. 2001). Diese biokompatiblen und resorbierbaren *scaffolds* sollen eine reproduzierbare und patientenindividuelle Therapie ermöglichen, welche die mit allogener Transplantation verbundenen Immunreaktionen minimiert (Dupoirieux et al. 1994). *Scaffolds*, die direkt und ohne vorherige Zellbesiedlung in den Organismus implantiert werden, werden von solchen unterschieden, die vor ihrer Implantation zunächst mit Zellen in vitro besiedelt werden (Stevens und George 2005). Beim 2. Ansatz kann so prinzipiell eine Auswahl der Zellen getroffen werden. Grundsätzlich wird bei der Herstellung von *scaffolds* versucht, dass diese soweit als möglich der ursprünglichen Knochenmatrix ähneln, sowohl in mechanischer als auch morphologischer Hinsicht (Stevens und George 2005; Green 2008).

Da das Knochenmark sowohl reich an Osteoblastenvorläuferzellen als auch an Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP ist, war die Autotransplantation von unfraktioniertem Knochenmark eine der ersten Techniken für die Behandlung von Knochendefekten (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Das Verfahren beinhaltet die Entnahme des Knochenmarks in Höhe der Crista iliaca und die Transplantation an die Stelle des Knochendefekts. Der Eingriff ist vergleichsweise einfach, mit niedrigen Kosten verbunden und erfordert keine besondere Genehmigung durch Behörden. Allerdings bedeutet die begrenzte Verfügbarkeit von Spongiosa, die durch Alter, Krankheit oder Bestrahlung noch weitere Einschränkungen erfahren kann, eine Limitierung dieser Methode

(Quarto et al. 1995). Dies gilt insbesondere für die Behandlung ausgedehnter Knochendefekte. Unterschiedliche Zellen sind bislang für das *tissue engineering* von Knochengewebe verwendet worden:

1. mesenchymale Stammzellen bzw. Stromazellen aus dem Knochenmark (Bruder et al. 1994),
2. periostale Zellen (Zhang et al. 2008),
3. Osteoblasten (Stangenberg et al. 2005).

ADSC vertreten eine andere Zellquelle für das *bone-tissue-engineering* (Marolt et al. 2010). Mehrere Gruppen haben die Bildung von Knochenkonstrukten nach Kultivierung von ADSC mit porösen *scaffolds* durchgeführt (Hattori et al. 2004; McCullen et al. 2009). Ausdifferenzierte Osteoblasten sind spezialisierte mesenchymale Zellen, die auf die osteogene Linie festgelegt sind. Dies hat den Vorteil einer schnellen und effektiven Reparatur des Knochendefekts, da die Zellen schon differenziert vorliegen. Der Hauptnachteil allerdings besteht in ihrer begrenzten Teilungsfähigkeit. Osteoblasten können nur eine limitierte Anzahl von Replikationszyklen durchlaufen, bevor das Problem der Enddifferenzierung auftritt (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Neuere zellbasierte Methoden zur Knochenregeneration beinhalten den Einsatz genetisch modifizierter Zellen (Liebermann et al. 1999).

Um Materialeigenschaften zu testen und unterschiedliche *scaffolds* zu vergleichen, werden in vitro-Untersuchungen mit Osteoblastenzelllinien auf Biomaterialien durchgeführt (Unger et al. 2009). Der Entwicklungsablauf eines osteoblastischen Zellphänotyps auf einem optimalen Biomaterial umfasst 3 aufeinanderfolgende Stadien, welche mit Hilfe von mikroskopischen und immunhistologischen Methoden verfolgt werden können: Proliferation, Matrixreifung und Mineralisation. Die Vaskularisation von künstlich hergestellten, besiedelbaren Biomaterialien nach deren Implantation ist von essentieller Wichtigkeit, da Zellen im Implantat, die durchschnittlich weiter als 200 µm von der Blutversorgung entfernt sind, aufgrund der limitierten Nähr- und Sauerstoffdiffusion, entweder metabolisch inaktiv oder nekrotisch werden. Für den Erfolg des *tissue-engineering* für die Knochenregeneration ist somit das Zusammenspiel aller Zelltypen und insbesondere die Interaktionen zwischen Osteoblasten und Endothelzellen von Bedeutung (Unger et al. 2009).

Bei Wachstumsfaktoren handelt es sich um von Zellen sezernierte Proteine, die als Signalmoleküle auf eine passende Zielzelle einwirken, um diese dann eine spezifische Funktion ausführen zu lassen. Wachstumsfaktoren dienen somit der interzellulären Kommunikation und beeinflussen entscheidende Funktionen wie zum Beispiel die Proliferation der Zellen, die Produktion



## 2. Literaturübersicht

---

extrazellulärer Matrix und die Differenzierung von Gewebe (Gerstenfeld et al. 2003). Sie spielen eine bedeutende Rolle für die Knochen- und Knorpelbildung, die Frakturheilung und die Regeneration von muskuloskeletalem Gewebe (Giannoudis und Pountos 2005). Die Bindung eines Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor initiiert einen intrazellulären Signalprozess. Vermittelt durch verstärkte oder verminderte Synthese mehrerer Proteine, sowie Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, kann dieser Signalprozess dann unterschiedliche Wirkungen, wie die Förderung und Inhibierung von Zelladhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung haben (Giannoudis et al. 2007). Diese Moleküle sind daher für die Entwicklung von Gewebe wesentlich und spielen somit auch eine bedeutende Rolle beim *tissue engineering*. Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren kommt sowohl im Knochen als auch in anderen Gewebearten vor. Die im Folgenden aufgelisteten kommen am häufigsten vor und sind gleichzeitig auch diejenigen, welche für den Einsatz beim *tissue engineering* von Knochen in Frage kommen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009):

1. *Bone morphogenetic proteins* (BMP),
2. *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ),
3. *Fibroblast growth factor* (FGF),
4. *Insulin-like growth factor I and II* (IGF I/II),
5. *Platelet derived growth factor* (PDGF).

Heute werden BMP auf Grund von Ähnlichkeiten in der Proteinstruktur und der Sequenzhomologie der Gruppe der TGF- $\beta$ -Proteine zugerechnet. BMP befinden sich üblicherweise eingeschlossen in der Knochenmatrix, sie werden aber auch während der frühen Phase der Frakturheilung exprimiert (Wozney 1989). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, zunächst mesenchymale Stammzellen an den Ort der Heilung zu rekrutieren und dann deren Differenzierung innerhalb der osteogenen Zelllinie zu stimulieren. Die stärksten osteoinduktiven Wirkungen besitzen die BMP 2, 4, 6 und 7 (auch OP-1 genannt) (Friedlaender et al. 2001; Giannoudis und Tzioupis 2005).

Daten einer Studie von Gabbay et al. (2006) zeigen, dass es eine progressive stimulatorische Wirkung auf ADSC hinsichtlich der Osteogenese in vivo gibt, wenn sie in einem 3-dimensionalen Kollagengel kultiviert werden, im Vergleich zu einer Kultivierung in einfachen Kulturflaschen. Kakudo et al. (2008) haben die Möglichkeit untersucht, einen aus Honigwaben gewonnenen Kollagenscaffold zur Kultur von ADSC im *bone-tissue-engineering* zu verwenden. Die ADSC werden für 14 Tage mit dem *scaffold* cokultiviert. Die elektronenmikroskopischen Bilddaten zeigen, dass das *scaffold* auch in tieferen Schichten mit ADSC besiedelt war. Diese cokultivierten *scaffolds* werden subkutan in Nacktmäuse transplantiert und nach 8 Wochen herausgenommen. Die

## 2. Literaturübersicht

---

Knochenbildung *in vivo* wurde histologisch untersucht und eine Knochenzellbildung festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Kollagen ein passendes *scaffold* für ADSC ist und als ein dreidimensionales Trägermaterial *in vitro* und *in vivo* Verwendung finden kann. Niemeyer et al. (2003) kommen zu ähnlichen Ergebnissen mit mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark und einer mineralisierten Kollagenmatrix, wie auch Donzelli et al. (2007), die eine unterstützende Wirkung des Kollagenscaffolds auf die Differenzierung und Verteilung der aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen feststellen konnten. Jedoch machen sie auch auf seine kurze Abbauphase aufmerksam und sahen dadurch eventuell eine Beschränkung für eine zukünftige Anwendung im *bone-tissue-engineering*. Ein weiteres potenzielles Trägermaterial ist Fibrinkleber. Fibrinkleber ist eine physiologisch relevante Matrix, deren Hauptbestandteil, das Fibrin, eine grundsätzliche Rolle bei der Blutgerinnung und Wundheilung übernimmt. Fibrinkleber, eine Zusammensetzung von Fibrinogen und Thrombin, ist ein passendes biologisches Trägermaterial für die Zelltransplantation, weil es biokompatibel und physiologisch abbaubar ist und zusätzlich eine Zellbindung bewiesen hat. Der fibrinstabilisierende Faktor XIII begünstigt die Wanderung von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen auf der Matrixstruktur des Klebers und erhöht die Proliferation der Stammzellen. Die Resorptionsrate des Fibrinklebers kann durch die Konzentration des fibrinolytischen Hemmstoffs Apoptin kontrolliert werden, was die Zellen im Defektbereich hält und eine Steigerung der Zellüberlebensrate, sowie eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften des Implantates zur Folge hat (Meinhart et al. 1999). Der Fibrinkleber bleibt *in situ*, während die Zellen wuchern und ins neue Gewebe differenzieren, bevor das *Trägermaterial* völlig resorbiert ist. Zusätzlich fördert der Fibrinkleber die Angiogenese über chemotaktische und mitogene Stimuli, was wiederum die Zellwanderung, Proliferation und Matrixsynthese fördert (Isogai et al. 2000). Fibrinkleber werden mit Erfolg in einer Studie als Trägermaterial verwendet, um mesenchymale Stammzellen im *bone-tissue-engineering* bei normalen und mit Chemotherapie behandelten Ratten zu transplantieren (Lee et al. 2005). In einer weiteren Untersuchung wird die Nützlichkeit von autologem Fibrinkleber als Trägermaterial für mesenchymale Stammzellen bei der Regeneration von Schädeldefekten am Kaninchen untersucht (Lee et al. 2008). Diese Studie demonstriert, dass autologer Fibrinkleber in Gegenwart von mesenchymalen Stammzellen die Knochenregeneration besser unterstützt als makroporöses biphasisches Kalzium-Phosphat. Weitere Studien unterstützen diese Untersuchung (Perka et al. 2000; Ito et al. 2006). Diese Ergebnisse rechtfertigen weitere Untersuchungen, um den Gebrauch von Fibrinkleber als Trägermaterial zu untersuchen (Lee 2008). Lee et al. (2003) und Hicok et al. (2004) sind die Ersten, welche zeigen konnten, dass die subkutane

## 2. Literaturübersicht

---

Implantation in Mäuse bzw. Ratten von menschlichen ADSC auf HA oder TCP *scaffolds* zur Bildung eines osteoidartigen Materials führt. Nachfolgende Studien haben seitdem versucht, diese Entdeckung in feststehenden Tiermodellen mit limitiertem Erfolg zu bestätigen (Dragoo et al. 2003; Hattori et al. 2006). Um ihre Fähigkeit zur Knochenbildung zu verbessern, behandeln viele dieser Studien ADSC mit dem osteogenen Wachstumsfaktor BMP2. Dragoo et al. (2003) und Peterson et al. (2005) sind die Ersten, welche die Technik der Knochenbildung durch ADSC in athymischen Nagetieren mit Hilfe des BMP2 beschreiben. Weitere Studien haben gezeigt, dass dieser osteogene Faktor gemeinsam mit Stammzellen Erfolg versprechend verwendet werden kann (Lieberman et al. 1999; Chang et al. 2004; Tsuda et al. 2005). Viele dieser Studien behaupten, dass die verbesserte Knochenneubildung der Anwesenheit von BMP2-behandelten ADSC zuzuschreiben ist. Jedoch, hat die Mehrheit dieser Arbeiten Probleme dies mit BMP2-Leerproben zu beweisen. Es ist schwierig zu sagen, ob die ADSC selbst für die verbesserte Knochenheilung verantwortlich sind oder die Heilung den starken osteokonduktiven und osteoinduktiven Effekten von BMP2 zugeschrieben werden muss (Zuk 2008). Daher sind Untersuchungen wie in der vorliegenden Studie erforderlich, um die wahre osteogene Kapazität von ADSC ohne ihre Kombination mit Wachstumsfaktoren, spezifisch zu bestimmen. In ersten Studien hierzu, verbessert die Implantation von osteoinduzierten Kaninchen ADSC in Gelantineschaumstoff-scaffolds in Schädeldefekte des Kaninchens die Knochenheilung im Vergleich zur Kontrolle nicht bedeutend (Dudas et al. 2006). In einer weiteren Studie werden aus weiblichen Mäusen ADSC, mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark, Osteoblasten aus Schädelknochen und Dura Mater Zellen gewonnen und auf mit Apatite behandelte Poly-Laktit-Glycolsäure-scaffolds transplantiert. Diese *scaffolds* wurden in 4 mm *critical size defects* des Schädels männlicher Mäuse eingesetzt. Nach 2, 4, 8 und 12 Wochen wird eine Analyse durchgeführt. Die Knochenneubildung wird mit Hilfe von histologischen Untersuchungen bestimmt. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigt jede Gruppe eine verbesserte Knochenneubildung innerhalb des 12-wöchigen Beobachtungszeitraums. Die Gruppen mit Osteoblasten, Stammzellen aus Knochenmark und ADSC zeigen nach 12 Wochen eine Defektfüllung von 70-90 %. Die Mineralisation des neu gebildeten Knochens ist in den Defekten mit Osteoblastentransplantation bedeutend höher im Vergleich zu den restlichen Gruppen. Es gibt keine wesentlichen Unterschiede bei der Mineralisation zwischen mit ADSC und Stammzellen aus Knochenmark behandelten Defekten (Cowan et al. 2004). Yoon et al. (2007) transplantiert undifferenzierte und differenzierte humane ADSC auf Polylactid-co-Glycolid-scaffolds in 8mm *critical size defects* der Schädelkalotte von athymischen Nacktratten. Die Ergebnisse zeigen eine

## 2. Literaturübersicht

---

verbesserte Knochenregeneration in den Defekten mit ADSC Transplantat. Weiterhin zeige sich eine bedeutend bessere Knochenheilung in den Defekten mit differenzierten ADSC, im Vergleich zu der Gruppe mit undifferenzierten ADSC Transplantaten. Beste Ergebnisse erhält man mit einer Kultivierungszeit in osteogenem Differenzierungsmedium von 14 Tagen (Niemeyer et al. 2003; Kakudo et al. 2008).

Klinische Anwendungen stellen für das *tissue-engineering* die wichtigste Prüfung dar. Allerdings befinden sich viele Ansätze auf diesem Gebiet erst in den Anfängen. Kennzeichnend für die bisherigen Studien sind die geringen Fallzahlen. Zumeist handelt es sich um Verlaufsbeobachtungen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Quarto et al. (2001) haben als erste berichtet, wie mittels eines zellbasierten *tissue-engineering*-Verfahrens ausgedehnte Knochendefekte (4–8 cm) beim Menschen erfolgreich behandelt werden können. Osteoblasten-Vorläuferzellen werden aus dem Knochenmark isoliert und in vitro vermehrt. Diese Zellen werden auf ein makroporöses Hydroxylapatitgerüst aufgetragen, welches in Größe und Form den Knochendefekten der Patienten entspricht und schließlich an der entsprechenden Läsionsstelle implantiert wird. Ein Fixateur externe stabilisiert anfänglich die Fraktur und wird später entfernt. Die Autoren berichten ab dem 2. Monat von ausgiebiger Kallusbildung entlang der Implantate und gutem Zusammenwachsen der Schnittstellen von Implantat und Knochen ohne Komplikationen. Eine komplette Fusion findet etwa 5–7 Monate nach dem chirurgischen Eingriff statt (Marcacci et al. 2007). Hernigou et al. (2005) injizieren bei 60 Patienten lokal Knochenmarkzellen bei Pseudarthrosen der Tibia. Hierbei wird keine zusätzliche Gerüstsubstanz (*scaffold*) verwendet. Eine Durchbauung kann in 88% der Fälle (bei 53 Patienten) erreicht werden. Die Autoren schließen daraus, dass bei größeren Knochendefekten die Rate erfolgreicher Heilungen durch Knochentransplantate direkt mit der Anzahl der an der Frakturstelle implantierten Zellen korreliert. Diese Studie stellt den ersten klinischen Versuch dar, die für eine erfolgreiche Fusion notwendigen Zellen zu quantifizieren (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). In einer anderen klinischen Studie werden 3 Patienten (2 Patienten mit Achondroplasie und 1 Patient mit kongenitaler Pseudarthrose) mittels Distaktionsosteogenese, sowie aus dem Knochenmark stammenden mesenchymalen Stammzellen und thrombozytenreichem Plasma behandelt. Die geplanten Distaktionsstrecken werden in allen Fällen ohne größere Komplikationen erreicht (Kitoh et al. 2004). In einem weiteren Fallbericht über den knöchernen Ersatz eines Daumenendglieds, diente als *scaffold* natürliches Hydroxylapatit von Korallen, das mit autologen, periostalen Zellen besiedelt wird (Vacanti et al. 2001).

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sind klinisch sehr unterschiedliche knöcherne Defekte anzutreffen. Das Spektrum reicht von Knochendefekten nach Zahnextraktionen und Zystenentfernung, bis zu einem ausgedehnten Knochenverlust nach Trauma oder Tumor (Ewers et al. 2003). Diese Defekte, die routinemäßig mit autologer Spongiosa oder gemahlenen Knochenspänen aufgefüllt werden, stellen ein optimales Einsatzgebiet für mittels *tissue engineering* hergestellte Transplantate dar. Die biomechanisch nur gering belasteten Defekte sind für hochporöse Zellträger, die eine nur geringe mechanische Festigkeit besitzen, aus klinischer Sicht ideal. In weiterer Folge ist eine routinemäßige autologe Transplantation von Biokomposits nicht nur zur Füllung kleinerer Defekte möglich, sondern auch zum Ersatz von Knochenfragmenten bei Patienten, bei denen es aufgrund unterschiedlicher Erkrankungen zu größeren Knochenverlusten am Kieferknochen gekommen ist (Ewers et al. 2003).

### 2.7.7. Protected bone healing

*Protected bone healing* (pbh) wird oft auch als *guided bone regeneration* (gbr) bezeichnet und hat zum Ziel, eine verbesserte Knochenregeneration über den Gebrauch von Barrieremembranen zum Schutz vor Weichteilgewebeforfällen in den Knochendefekt zu erreichen (Dahlin et al. 1988). Dieses Konzept wird vor 50 Jahren eingeführt, als Zelluloseazetatmembranen für die Regeneration von Nerven und Sehnen experimentell verwendet werden (Campbell et al. 1956; Ashley et al. 1959). Murray et al. (1957) berichteten über verbesserte Knochenbildung nach Einsetzen von perforierten Kunststoffmembranen, welche bei Oberschenkeldefekten beim Hund angewendet werden. Nachfolgende Tierstudien meldeten verbesserte Knochenheilung von Rippenfrakturen und Oberschenkelknochendefekten bei der Anwendung von Zelluloseazetatmembranen und Milliporemembranen (Hurley et al. 1959; Rüedi und Bassett 1967). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sind erfolgreiche Ergebnisse auch beim Verbringen von mechanischen Barrieren über Kieferdefekte beim Kaninchen (Kahnberg 1979) und über Schädeldefekte bei Ratten (Melcher 1969) berichtet worden. Diese experimentellen Studien zeigen, dass die Knochenregeneration bedeutend erhöht wird, wenn die Invasion des weichen Gewebes in den Defektbereich mechanisch verhindert wird. Verschiedene nicht resorbierbare und resorbierbare Membranmaterialien sind in experimentellen und klinischen Studien im Zusammenhang mit der pbh-Behandlung verwendet worden. Die wünschenswerten Eigenschaften von für die pbh-Therapie verwendeten Barrieremembranen sind Biokompatibilität, Zellbarrierefunktion, Gewebeintegration und die einfache klinische Anwendung (Karring et al. 1993). Die nicht resorbierbaren Barrieremembranen müssen in einem zweiten chirurgischen Eingriff entfernt werden. Dieser Nachteil führt zur

## 2. Literaturübersicht

---

Entwicklung von resorbierbaren Membranen. Mehrere resorbierbare Materialien finden mit unterschiedlichem Erfolg in der Knochenregeneration Verwendung: Kollagen Typ I, Polyurethan, Polyglactin 910, Polymilchsäure, Polyglycolsäure, Polyorthoester und verschiedene Copolymere. Wenn man diese Membranen in ein biologisches System transplantiert erleben die resorbierbaren Polymere vier Stufen der Degradierung:

1. Hydration,
2. Stabilitätsverlust,
3. Substanzverlust,
4. Auflösung über Phagozytose (Retzepe und Donos 2010).

Die Zeitspanne, welche für den Membranabbau benötigt wird hängt von der Art des Polymers, des pH-Wertes, der Temperatur, des Polymerkristallisationsgrades und des Membranvolumens ab (Warrer et al. 1992; Hämmerle und Jung 2003). Dahlin et al. (1988) standardisieren den pbh-Grundsatz an Ratten mit 5mm Durchmesser transmandibulären Defekten. Sechs Wochen postoperativ sind die Mandibuladefekte, welche mit Polytetrafluoräthylenmembranen (e-PTFE) bedeckt sind, mit Knochen vollkommen durchbaut. Die Defekte ohne pbh weisen fasriges Gewebe, eine muskulöse Gewebeinvasion im Defektgebiet und eine dadurch verschlechterte Defektheilung auf. In einer nachfolgenden experimentellen Studie wird ein ähnliches Modell mit *critical size defect* in Rattenunterkiefern verwendet, um die pbh Behandlungswirkung im Anschluss an die Anwendung von resorbierbaren Membranen zu bewerten. Die Autoren weisen allmähliche Regeneration des mandibulären Knochens vom 15. bis 180. Tag postoperativ nach, wohingegen die Bildung von neuem Knochen in nicht pbh behandelten Kontrollseiten nach 1 Monat stagniert (Kostopoulos et al. 1994). Die Wirkung von nicht resorbierbaren oder von resorbierbaren Membranen auf die Behandlung der *critical size defects* von Ober- oder Unterkiefern ist weiter in verschiedenen experimentellen Modellen an Ratten untersucht worden (Sandberg et al. 1993; Bartee und Carr 1995; Zellin et al. 1995; Matzen et al. 1996; Zahedi et al. 1998; Ohnishi et al. 2000). Im Laufe der letzten Jahrzehnte findet eine Reihe von polyglykoliden und polylactiden Membranen für das pbh Verwendung (Sverzut et al. 2008). Eine besonders erfolgreiche Variante ist die resorbierbare poröse Membran Poly(L-lactide-co-D,L-lactide), welche auf ihren Einfluss auf die Regeneration von *critical size* Knochendefekten in verschiedenen Tiermodellen mit unterschiedlicher Porengröße erfolgreich getestet wurde (Pineda et al. 1996; Gugala und Gogolewski 2002).

### 2.8. Critical-size Defektmodell des Knochens

Knochendefekte kritischer Größe (*critical size defects*) sind die Hauptstütze von vorklinischen Studien geworden, um Strategien zur Knochenreparatur zu bewerten und zu vergleichen. 2009 veröffentlicht die *American Society for Testing and Materials* den „*Standard Guide for Preclinical In Vivo Evaluation in Critical Sized Segmental Bone Defects*“ (F2721-09) (ASTM 2008), welcher als Quelle dient. *Critical size defects* werden als Defekte definiert, welche ohne ein medizinisches Eingreifen nicht ausheilen werden. Der Oberschenkelknochen oder die Tibia finden oftmals Verwendung, der Nachteil ist aber, dass diese Methoden eine zusätzliche Fixierung benötigen. *Critical size* Knochendefektmodelle an Radius, Ulna und Metatarsus finden ebenfalls Verwendung und können oftmals ohne zusätzliche Fixierung durchgeführt werden. Die wirkliche Defektgröße, welche notwendig ist, um eine Heilung ohne Eingreifen auszuschließen, ändert sich mit der Tierart und der anatomischen Lage des Defektes. Zylindrische Defekte in Knochen der Maus, der Ratte und des Kaninchens sind oftmals der Ausgangspunkt für die Bewertung von Biomaterialien. Sie stellen eine stabile mechanische Umgebung zur Verfügung, die ein inneres Fixieren nicht verlangt (Muschler et al. 2010). Für die Untersuchung von Biomaterialien und chirurgischen Strategien in der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie werden einige Tiermodelle etabliert, einschließlich *critical size defects* des Schädels (Schmitz et al. 1990; Mardas et al. 2002; Pang et al. 2004; Kanou et al. 2005; Develioğlu et al. 2006; Sawyer et al. 2009; Umoh et al. 2009) und der Mandibula (Saadeh et al. 2001; Schortinghuis et al. 2003) bei Ratten. Vorteil des *critical size defect* an der Mandibula ist die mechanische Belastung während des Kauvorganges, welche die Proliferation von Osteoblasten stimuliert (Wiesmann et al. 2004).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Fettabgeleitete Stammzellen

Das Fettgewebe zur Gewinnung der humanen ADSC wurde im Rahmen eines Routineeingriffes in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Gießen gewonnen. Es wurden nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Patienteneinwilligung und unter Bewilligung der Ethikkommission der Universität Gießen (Antragsnummer: 141/04) bei einem 45-jährigen Spender am dorsalen Beckenkamm 40g Fettgewebe entnommen. Für die in vitro Versuche wurden ADSC aus Fettgewebebiopsien eines Patienten isoliert und bis Passage drei kultiviert. Zellen in dritter Passage wurden kryokonserviert oder direkt in vitro verwendet.

#### 3.1.1. Isolierung von ADSC

Die Isolierung der Stammzellen wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank mit Laminar Flow durchgeführt, sofern nicht anders angegeben.

Die ADSC wurden nach einem leicht modifizierten, standardisierten Protokoll von Zuk et al. (2001) isoliert. 40g Fettgewebe wurde nach der Entnahme mit Schere und Pinzette zerkleinert und danach in ein Sieb (*cell dissociation sieve*) mit einem *60 mesh screen* überführt. Das im Sieb befindliche Fettgewebe wurde unter Zuhilfenahme eines Stößels und Ringer-Laktat-Lösung gewaschen, bis keinerlei blutige Verfärbungen mehr zu erkennen waren. Anschließend erfolgte die enzymatische Verdauung. Dazu wurde das von Blutbestandteilen gereinigte Fettgewebe in zwei 50 ml Falcon Röhrchen zu je 20 ml überführt und mit 20 ml auf 37°C vorgewärmter Ringer-Laktat-Lösung, 2 ml Citrat und 0,625 ml Liberase versetzt und bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde unter ständigem Schwenken inkubiert. Im Röhrchen bildete sich nach dem Dichtegradienten eine obere Fettphase und eine untere Flüssigphase, in der sich die Stammzellen als Suspension befanden. Die Flüssigphase wurde mit einer 20 ml Pipette abpipettiert und in ein weiteres 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Diese Probe wurde bei 1200 G für 10 Minuten abzentrifugiert. Weitere Bestandteile der Fettgewebebiopsie wie Adipozyten oder Blutbestandteile konnten so entfernt bzw. reduziert werden. Im unteren Bereich der Probe befand sich nun ein festes Zellpellet, welches die Stammzellen enthielt. Die obere flüssige Phase wurde abpipettiert. Das Zellpellet wurde mit 30 ml Expansionsmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen



ausplaziert. Es wurden Standardbedingungen zur Zellkultur verwendet (37°C, 6% CO<sub>2</sub>). Nach 24 h wurden nicht adhärenente Zellen, wie eventuell verbliebene Erythrozyten und Leukozyten, durch Waschen der Kulturflaschen mit PBS entfernt und das Kulturmedium komplett gewechselt. Da Stammzellen die einzigen adhärenenten Zellen sind, erhält man nach den ersten Mediumwechseln eine reine Stammzellkultur (Zuk et al. 2001). Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Mit Hilfe des inversen Mikroskops wurden die Kulturen täglich morphologisch beurteilt und ihr Wachstum kontrolliert.

#### **3.1.2. Passagieren der ADSC**

Sobald die adhärenenten Stammzellen eine Konfluenz von circa 90% erreicht hatten, wurden sie mit Hilfe von Trypsin-EDTA in Suspension gebracht. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit PBS gespült. Anschließend wurden 5 ml Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben. Nach 5 Minuten haben sich die Zellen aus ihrer Bindung gelöst und es ist eine Zellsuspension entstanden. Die proteolytische Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 ml Expansionsmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Suspension wurde bei 1200 G für 10 Minuten abzentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abpipettiert und das gebildete Zellpellet in 9 ml Expansionsmedium resuspendiert und je zu einem Drittel mit 30 ml Expansionsmedium in Kultur ausplaziert.

#### **3.1.3. Kryokonservierung der ADSC**

Regelmäßig wurden überschüssige ADSC zur Konservierung eingefroren. Dazu wurden sie wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit 10 ml Expansionsmedium abzentrifugiert. Anschließend wurden Portionen mit jeweils 500.000 Stammzellen mit 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden für 2 Tage bei -70 °C gelagert, bevor sie anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert und so für mehrere Jahre konserviert wurden.

#### **3.1.4. Auftauen der ADSC**

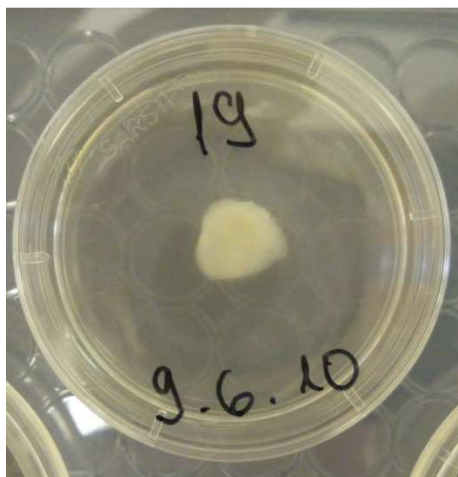
Das Auftauen der Stammzellen musste aufgrund des zelltoxischen DMSO zügig durchgeführt werden. Daher wurden die Kryoröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C für 2 Minuten aufgetaut, die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und zusammen mit 10 ml Expansionsmedium bei 1200 G für 5 Minuten abzentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 30 ml frischem Expansionsmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in neuen 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät, die dann im Brutschrank gelagert wurden.

#### 3.1.5. Kollagenscaffold

Um den Stammzellen ein dreidimensionales Gerüst vorzugeben, in das sie schon vor Implantation in die Ratte einwachsen können, wurde sich für einen biologisch organischen Knochenersatzstoff aus equinem Kollagen als *scaffold* entschieden. Dazu wurden die *scaffolds* 14 Tage lang mit den ADSC kultiviert um zu gewährleisten, dass sie genügend Zeit haben sich in dem gesamten Trägermaterial über seine Poren dreidimensional auszubreiten. Das Trägermaterial besteht aus einem individualisierten Kollagenkegel, der durch Osteokonduktivität nach einer Zahnextraktion zu einer besseren Regeneration einer Extraktionsalveole führen soll (Parasorb®, Resorba Wundversorgung GmbH + Co. KG, Nürnberg, Deutschland). Vorteile dieser *scaffolds* aus Kollagen ist die Osteokonduktivität, die stabile Struktur und der Schutz des Defektes vor einem Eindringen von Weichteilgewebe, die rasche Integration im umliegenden Gewebe und ein einfaches Zuschneiden sowie seine geringe Röntgendichte. Die Dentalkegel waren Vorserienmuster mit einem Durchmesser von 1,2 cm und einer Höhe von 1,6 cm, die im Vergleich zu den auf dem Markt verfügbaren Produkten eine höhere Porösität mit einer Porengröße von 200 µm aufwiesen. Ein Dentalkegel enthält 22,4 mg equine, native, hochreine Kollagenfibrillen.

#### 3.1.6. Besiedlung des Kollagenscaffolds

Zunächst wurden die Kollagenkegel unter einer Sterilwerkbank mit Hilfe von Skalpell und Pinzette zylindrisch zugeschnitten mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Dicke von 1 mm. Die Stammzellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgelöst, gezählt und in 10 ml Expansionsmedium abzentrifugiert. Anschließend wurden die Stammzellen resuspendiert und jeweils 15 µl Expansionsmedium mit 500.000 Stammzellen auf das *scaffold*, welches sich in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm befand, mittels Pipette aufgetropft. Die Zellen befanden sich in Passage drei. Des Kollagenscaffold saugte diese Zellsuspension aufgrund seiner erhöhten Porengröße sofort auf. Nach 45 Minuten wurden der Matrix zunächst 0,5 ml und nach weiteren 45 Minuten 1,5 ml Expansionsmedium hinzugegeben. Die Kollagenmatrizen und die Stammzellen wurden für 14 Tage unter Standardbedingungen kultiviert (Abbildung 2). Es wurde jeden zweiten Tag ein Mediumswechsel mit 2 ml Expansionsmedium durchgeführt. Um auszuschließen, dass die Stammzellen bei einem Mediumswechsel aus dem *scaffold* geschwemmt wurden und außerhalb dieses wachsen, wurden die Proben unter dem inversen Mikroskop regelmäßig untersucht.



**Abbildung 2:** Kollagenscaffold (weiß, Mitte) nach 14 tägiger Kultivierung mit ADSC (*adipose derived stem cells*) in Zellkulturschale vor Entnahme und Transplantation in den *critical size defect* des Rattenunterkiefers.

#### 3.1.7. Charakterisierung der ADSC mittels Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer erlauben mit sehr hoher Flexibilität die quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung intakter Zellen. Die derzeit für analytische Anwendungen und insbesondere in der Diagnostik eingesetzten Durchflusszytometer zeichnen sich durch einen geschlossenen Messaufbau aus, bei dem mit einer vom Hersteller vorjustierten Laser-Einkopplung und Optik die Analyse von Zellen in einem geschlossenen Probenstrom in einer Küvette erfolgt. Die durchflusszytometrischen Analyse basiert auf der Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenzen in dem Moment, in dem die Zellen in Größen zwischen 0,2 und 20  $\mu\text{m}$  einen rechtwinklig zum Probenfluss angeordneten Laserstrahl, hydrodynamisch fokussiert, innerhalb eines laminaren Probenstroms passieren (Abbildung 3). Am Messpunkt, dem gemeinsamen Fokus des Probenstroms und eines Lasers als monochromatischer Lichtquelle, dienen die Streuung des Anregungslichts und die Anregung von fluoreszenten Markern der simultanen Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der einzelnen Zellen. Für eine optimale Anstrahlung muss der Flüssigkeitsstrom die Partikel möglichst in die Mitte der Messkammer durch den Laserstrahl transportieren (*interrogation point*). Außerdem soll jeweils nur eine Zelle oder Partikel den Laserstrahl passieren. Um dieses ausführen zu können, wird die Probe in die Messzelle und den Strom der schnell fließenden Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) oder auch Mantelflüssigkeit genannt unter höherem Druck “injiziert”. Die Messkammer eines Zytometers wird Durchflusszelle genannt. Der Probenstrom wird aufwärts durch eine optisch klare Region der Durchflusszelle (Küvette) unter Druck gesetzt.

### 3. Material und Methoden

---

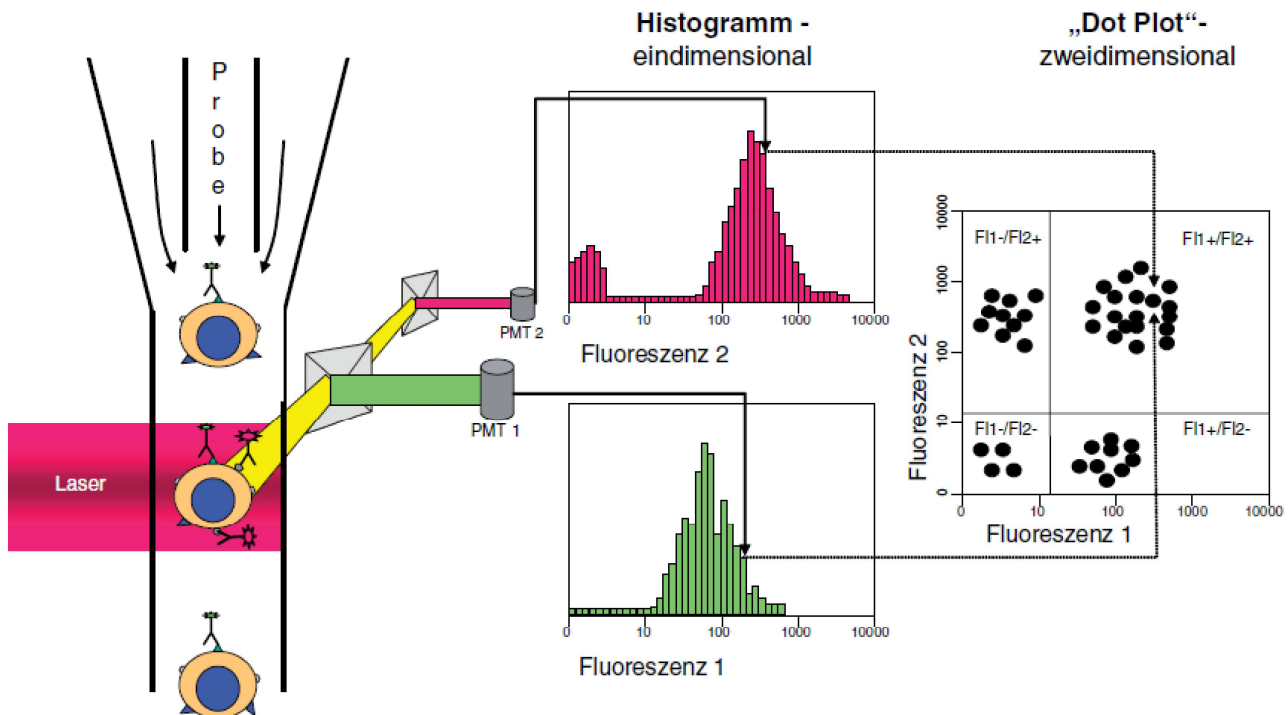
In der Durchflusszytometrie tritt dann Lichtstreuung auf, wenn ein Partikel einer kolloidalen Lösung das einfallende Laserlicht ablenkt (TYNDALL-Effekt). Das Maß dieser Streuung hängt von den physikalischen Eigenschaften des Partikels ab, nämlich von seiner Größe und internen Komplexität. Faktoren, die die Lichtstreuung beeinflussen, sind die Zellmembran, der Kern und alle granulären Zellkomponenten (z.B. Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat). Ebenso tragen die Zellform und Oberflächenbeschaffenheit zur totalen Lichtstreuung bei. Ein Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften absorbiert Lichtenergie in einem Bereich, der charakteristisch für diese Verbindung ist. Die Energie des absorbierten Lichts hebt ein Elektron des Moleküls in einen höheren Energielevel. Das angeregte Elektron geht schnell in den Grundzustand zurück und emittiert die überschüssige Energie als Lichtquant in Form eines Photons. Dieser Energieübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu den gebundenen Fluorochromen. Je mehr gebundene Fluorochrome, umso mehr Fluoreszenz wurde emittiert und umso höher ist die Fluoreszenzintensität. Der Energiebereich des Lichtes, innerhalb dessen eine Fluoreszenzverbindung angeregt werden kann, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet. Weil mehr Energie im Absorptionsübergang verbraucht, als im Fluoreszenzübergang emittiert wird, sind die emittierten Wellenlängen länger bzw. größer als die absorbierten. Der Bereich der emittierten Wellenlängen für eine Einzelverbindung wird als Emissionsspektrum bezeichnet. Es können mehr als ein Fluorochrom gleichzeitig verwendet werden, wenn jedes sich bei 488 nm anregen lässt, und die Wellenlängen der entsprechenden Emissionspeaks sich nicht extrem überlappen. Um den Überlappungsbereich zu korrigieren, muss kompensiert werden was bedeutet, dass der Anteil der Überlappung berechnet wird und dann jeweils subtrahiert wird. Ist ein Fluoreszenzfarbstoff an einem monoklonalen Antikörper gebunden, dann kann dadurch, basierend auf den einzelnen Antigen-Oberflächenmarkern der Zelle, die Identifizierung eines bestimmten Zelltyps erfolgen. Die den physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen entsprechenden Lichtsignale werden quantifiziert und in einer multiparametrischen Messung für jede Zelle einzeln in einen Datenspeicher geschrieben.

Das elektronische System wandelt die Lichtsignale in den Detektoren zuerst in elektronische und dann in digitale Signale um, die dann vom Computer bearbeitet werden können. Die Lichtsignale werden durch Photodetektoren in elektronische Signalepulse (Spannungsveränderungen) umgewandelt und nachfolgend bei der Daten-Digitalisierung in entsprechende Messkanalwerte klassifiziert. Die Durchflusszytometriedaten werden gemäß einem Standardformat, dem *flow cytometry standard*, gespeichert. Der Computer speichert die Daten des Zytometers als sogenannte

### 3. Material und Methoden

---

*listmode* Dateien. In einer Darstellung können gleichzeitig zwei Messparameter dargestellt werden. Als zweidimensionale Darstellungen sind so genannte *dot-plots* (Punktwolkendarstellungen) üblich. Hier werden auf der x- und y-Achse jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messparametern aufgetragen. In einer 1- oder 2-D Darstellung kann mit Hilfe der grafischen Maus eine Region auf dem Computerbildschirm gezeichnet werden, die nur eine Teilmenge der dargestellten Messereignisse umfasst. Die Region wird dazu benutzt, um die Eigenschaften der darin enthaltenen Partikel für die weitere Analyse zu definieren. Dort lassen sich auch Regionen definieren, in denen der Anteil einer markierten Population unter allen dargestellten Zellen ermittelt werden kann. Zur Immunphänotypisierung von Zellen ist vor allem die eindeutige Beschreibung der Zellen im entsprechenden Probenmaterial wichtig. Besonders zu beachten ist, dass viele Antigene auf mehreren Populationen von Zellen exprimiert werden, so dass lediglich eine Kombination von Antikörpern zu einer eindeutigen Beschreibung der Zellen führt. Die Vorteile der Durchflusszytometrie z.B. gegenüber der Immunfluoreszenz sind die genauen Aussagen zu Intensität der Fluoreszenz, die Erfassung großer Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit, gleichzeitige Erfassung von zwei morphologischen und bis zu fünf oder mehr Fluoreszenzparametern je Zelle. Die Computeranalyse ermöglicht die Typisierung von Subpopulationen. (Sack et al. 2006; Zeilinger und Hübl 2006).



**Abbildung 3:** Korrelierte Darstellung von Messsignalen bei der Durchflusszytometrie. Für jede einzelne Zelle werden gleichzeitig mehrere Fluoreszenzsignale aufgenommen. Während Histogramme darstellen, mit welcher Häufigkeit einzelne Fluoreszenzintensitäten erreicht werden, erlauben Dot-Plots den Zusammenhang von Fluoreszenzsignalen darzustellen. (Quelle: Sack, Tarnok und Rothe (2006). „Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie“. Karger Verlag, S. 49.)

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Nelli Baal durchgeführt.

Damit man sicher sein konnte, dass es sich bei den in Kultur befindlichen Zellen, um Zellen mit Stammzeleigenschaften handelt, musste man sie entsprechend verifizieren. Nach ausführlicher Recherche (Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2001; 2002; De Ugarte et al. 2003; Strem et al. 2005; Meliga et al. 2007) wurde sich für 5 verschiedene stammzellspezifische Oberflächenmarker CD 105, CD 49d, CD 166, CD 13 und STRO-1 zur phänotypischen Charakterisierung der Zellen entschieden.

Konfluente Kulturen von ADSC der Passage drei und zehn wurden wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit PBS gewaschen und gezählt. Zur Messung der Autofluoreszenz wurden Leerproben mit 650.000 Zellen in 10 µl PBS gescannt. Eine Kompensation der

### 3. Material und Methoden

---

Autofluoreszenz aus den Ergebnissen war in diesem Fall nicht nötig, da die Zellen eine sehr geringe Autofluoreszenz zeigten. Um den Wellenlängenbereich der Fluorochrome zu ermitteln wurden zwei Ansätze mit 100 µl stain buffer, 60 µl BD™ CompBeads Negative Control bzw. BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ beads und 20 µl der jeweilig zu testenden Antikörpersuspension 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben bei 200 G für 10 Minuten abzentrifugiert, in 500 µl stain buffer resuspendiert und mit dem Durchflusszytometer untersucht. Da sich die Wellenlängen der Fluorochrome der Antikörper CD 49d und CD 166 zu stark überlappten, wurden zwei Proben angesetzt. Bei den verschiedenen Fluorochromen einer Probe wurde eine Kompensation mit Hilfe der Software durchgeführt. Jeweils 650.000 Zellen wurden mit 10 µl PBS, 5 µl pro 10<sup>6</sup> Zellen CD 105 Antikörpersuspension und STRO-1 Antikörpersuspension und 20 µl pro 10<sup>6</sup> Zellen CD 166 Antikörpersuspension und CD 13 Antikörpersuspension in Probe 1 versetzt. In der zweiten Probe wurde CD 166 Antikörpersuspension durch 20 µl CD 49d Antikörpersuspension ersetzt. Die beiden Proben wurden für 45 Minuten auf Trockeneis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie mit 2ml PBS gewaschen, bei 300 G für 10 Minuten abzentrifugiert und in 300 µl PBS resuspendiert. Diese Proben wurden dann mit dem BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, USA) untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der Software BD FACS Diva 6.0 (BD Biosciences, San Jose, USA).

#### **3.2. In vivo Versuch Rekonstruktion von Unterkieferdefekten der immundefizienten Ratte**

In dem vorliegenden Modell wurden athymischen und dadurch immundefizienten Ratten standardisierte Knochendefekte (*critical size defect*) im Bereich des Unterkieferwinkels gesetzt, die ohne therapeutische Maßnahmen nicht spontan ausheilen würden. Je nach Versuchsprotokoll wurden den Ratten undifferenzierte ADSC in verschiedenen Trägermaterialien wie Fibrin und Kollagen, eine resorbierbare makroporöse Folie zum *protected bone healing*, autologes Knochentransplantat oder eine Kombination der verschiedenen Therapien eingesetzt. Damit sollte zum einen die osteogene Potenz von ADSC in unterschiedlichem Trägermaterial geklärt werden und zum zweiten mit den gegenwärtig üblichen Verfahren zur Knochenrekonstruktion und dem derzeitigen „Goldstandard“, dem autologen Knochentransplantat, in Bezug auf die Knochenregenerationsrate verglichen werden.

#### 3.2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich zu Versuchszwecken gezüchtete immundefiziente athymische Nacktratten (CrI:NIH-Foxn1<sup>nu</sup>) eingesetzt. Die rnu-Mutation trat in einer Auszucht-Kolonie von Rowett Hooded Ratten in Schottland auf. Seit 1994 erfolgt die Zucht bei Charles River Deutschland. Alle Ratten waren männlich und wurden von Charles River Deutschland GmbH Sulzfeld im Alter von 6 Wochen bezogen und in einem Alter von 7 bis 9 Wochen mit einem Gewicht von 250 bis 290 Gramm operiert. Die Tiere wurden über die gesamte Versuchszeit im zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten und standen ständig unter veterinärmedizinischer Kontrolle. Untergebracht waren die Tiere auf autoklavierten Weichholzspänen Grade 6 (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) präoperativ in Gruppenhaltung mit bis zu 5 Tieren in Macrolon-Käfigen der Größe IV mit erhöhten Käfigdeckeln und postoperativ in Einzelhaltung in Macrolon-Käfigen der Größe III mit erhöhte Käfigdeckeln. Als Käfig-*enrichment* dienten den Ratten zugeschnittene Spieltunnel (Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland). Die rnu-Ratten wurden in einem separierten Raum bei einer Raumtemperatur von 22-24 °C, einer Luftfeuchte von 40%, einem Luftwechsel von 15-20 n/Stunde und einem Hell-Dunkel Wechsel von 12 h gehalten. Gefüttert wurden die Tiere mit Altromin 1324 TPF Haltungsdiät für Ratten und Mäuse Alleinfuttermittel für Versuchstiere total pathogenfrei vakuumiert (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) ad libidum. Wasser stand in Nippeltränken ebenfalls ad libidum zur Verfügung. Der Tierversuch wurde vor Beginn der Studie von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen (Geschäftszeichen: V54-19c20/15(1)GI20/10 Nr. 41/2005) genehmigt.

#### 3.2.2. Gruppeneinteilung und chirurgischer Eingriff

Nach der statistischen Vorplanung unter Berücksichtigung der Zielparameter und Gruppeneinteilung in Zusammenarbeit mit der AG Medizinische Statistik am Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Dr. R.-H. Bödeker) wurde eine Gruppengröße von 10 Tieren pro Untersuchungsmaterial festgesetzt. Zunächst wurde nach Vorgabe des Regierungspräsidiums ein Pilotversuch mit 4 Tieren zum Nachweis der Durchführbarkeit und der Wirksamkeit durchgeführt. Hiernach wurden 5 Versuchsgruppen für die Studie geplant (Tab. 1).



### 3. Material und Methoden

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Mandibulaseite 1	Kontrollseite	pbh	Kontrollseite	<i>scaffold</i>	pbh, Fibrinkleber ADSC
Mandibulaseite 2	pbh	pbh Fibrinkleber ADSC	autologes Knochen- transplantat	<i>scaffold</i> ADSC	pbh <i>scaffold</i> ADSC

**Tabelle 1** Darstellung der 5 Versuchsgruppen; Gruppengröße n=10; *split mouth* Studie; Therapieseiten *critical size defect*: Kontrollseite ohne Transplantat, pbh (*protected bone healing*) ohne Transplantat, pbh mit 500.000 ADSC (*adipose derived stem cells*) eingebettet in Fibrinkleber, Transplantation eines Kollagenscaffold, Transplantation eines Kollagenscaffold nach 14 tägiger Kultivierung mit ADSC mit und ohne pbh.

Die chirurgischen Eingriffe wurden ausschließlich im Operationssaal des zentralen Tierlabors der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Die rnu-Ratten wurden zunächst tierärztlich untersucht und bei ungestörtem Allgemeinbefinden gewogen. Anschließend wurden sie mit 1 ml/kg KG Ketamin 10%® (100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid, bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und 0,2 ml/kg KG Domitor® (0,2 mg/kg KG Medetomidinhydrochlorid, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) intraperitoneal narkotisiert. Den Ratten wurde das Operationsfeld rasiert, gereinigt und desinfiziert, sowie mit 0,4 ml/kg KG Xylocain 1% mit Adrenalin (4 mg/kg KG Lidocainhydrochlorid und 0,002 mg/kg KG Epinephrin, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) lokal anästhesiert. Zur Operation wurden die Ratten in Seitenlage positioniert und die Körpertemperatur mit einem Wärmekissen konstant gehalten. Es wurde ein circa 2 cm großer Hautschnitt vom caudalen Unterkieferrand nach rostral durchgeführt. Über den Musculus masseter wurde sich unter Schonung der nervalen Versorgung auf den Unterkieferwinkel vorpräpariert. Mit Hilfe eines Raspatoriums wurde die Kaumuskulatur lingual und buccal vom Knochen gelöst. Unter Schutz der lingualen Kaumuskulatur durch das Raspatorium wurde ein Trepanbohrer von buccal im Abstand von 10 - 15 mm zum Margo ventralis und caudalis der Mandibula angesetzt und ein 5mm im Durchmesser großer *critical size defect* gesetzt. Je nach Versuchsprotokoll wurde unterschiedlich weiter verfahren. In Gruppe 1 wurde der Defekt auf einer Mandibulaseite als Kontrolle ohne Therapie belassen und auf der Gegenseite wurde lingual und buccal des Defekts eine chirurgische, resorbierbare makroporöse Folie aus Copolymer mit einem Verhältnis 70:30 Poly (L-lactid-co-D,L-lactid) (Orthopaedic Sheet 160mm x 200mm x 0,5mm,

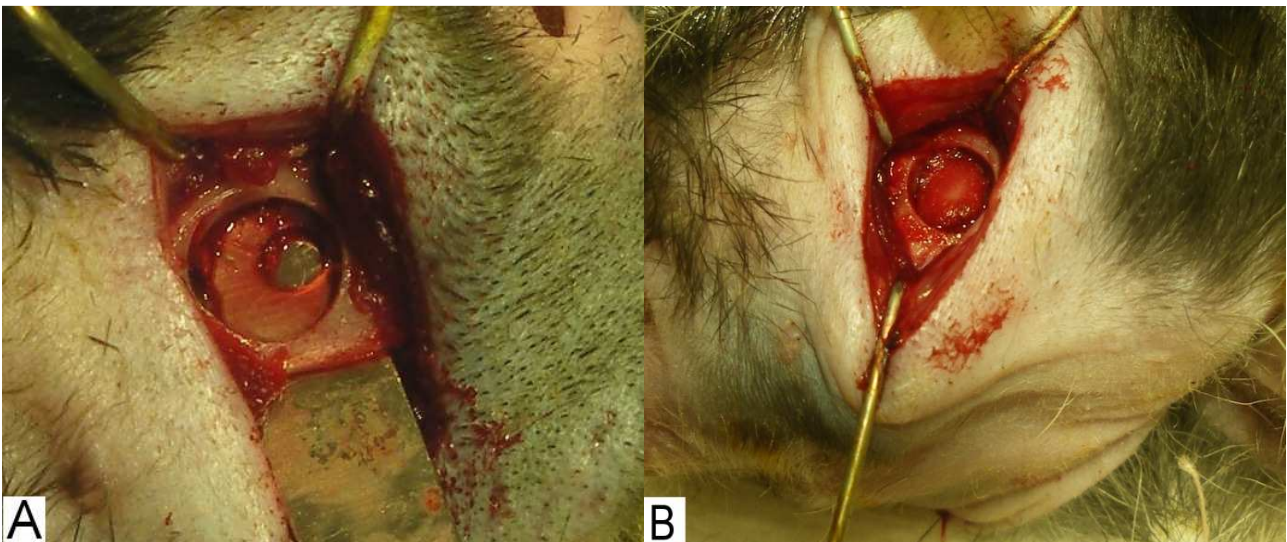
### 3. Material und Methoden

---

MacroPore Biosurgery, San Diego, USA) eingesetzt, um diesen vor umgebenden Weichteilgewebe abzuschirmen (pbh) (Abbildung 5). Bei Gruppe 2 wurden kurz vor Beginn der Operation im Forschungslabor 500.000 ADSC wie oben beschrieben mit Trypsin-EDTA abgelöst und abzentrifugiert, anschließend wurde das Zellpellet mit 20 µl PBS in einem Eppendorfröhrchen resuspendiert und unter Kühlung auf Trockeneis in den Operationssaal verbracht. Die Zellen wurden in Fibrinkleber (Beriplast® P Combi-Set 0,5 ml, CSL Behring GmbH, Hattersheim am Main, Deutschland) integriert und mit Hilfe eines Formgebers aus Acrylglas (Feinmechanische Werkstatt, Physiologisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen) ein 5mm im Durchmesser großes zylindrisches Pellet geformt, welches auf einer Mandibulaseite in den Defekt transplantiert wurde, zusätzlich wurde der Defektbereich durch pbh geschützt. Der Fibrinkleber diente dazu, die Stammzellen im Defektbereich zu fixieren. Zwischen der Entnahme der Stammzellen aus der Kultur und der Transplantation in den Defektbereich vergingen somit nicht mehr als 20 Minuten. Auf der Gegenseite wurde analog zu Gruppe 1 pbh durchgeführt. In Gruppe 3 wurde der Defekt auf einer Unterkieferseite ohne Therapie belassen und auf der Gegenseite wurde ein autologes Knochentransplantat eingesetzt. Dazu wurden die entnommenen Kompakta-Knochenstücke der Defektregion zerkleinert, sowie mit Natriumchloridlösung 0,9% (B. Braun, Melsungen, Deutschland) gespült und anschließend reimplantiert (Abbildung 4). Bei Gruppe 4 wurde ein Kollagenscaffold, welcher zuvor zusammen mit 500.000 ADSC für 14 Tage kultiviert wurde, circa 15 Minuten nach Entnahme der Zellkulturschale aus dem Inkubator in die Defektregion einer Unterkieferseite transplantiert (Abbildung 5). Auf der Gegenseite wurde ein auf Defektgröße zugeschnittenes Kollagenscaffold ohne Stammzellen eingesetzt. Analog zu Gruppe 4, wurde bei Gruppe 5 ein Kollagenscaffold mit ADSC auf einer Mandibulaseite in den *critical size defect* eingesetzt und auf der Gegenseite wurden 500.000 ADSC eingelegt in Fibrinkleber, analog zu Gruppe 2, transplantiert. Auf beiden Seiten wurde zusätzlich pbh durchgeführt. Muskulatur und Haut wurden zweischichtig mit resorbierbarem Nahtmaterial Vicryl 4-0, ungefärbt, geflochten (Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) vernäht und die Naht mit Gewebekleber auf Cyanacrylat-Basis LIQUIBAND™ (MedLogic Global Limited, Plymouth, England) bedeckt. Die Operationszeit betrug im Durchschnitt 45 Minuten.



**Abbildung 4:** Ratte intraoperativ; OP-Bereich durch Wundspreizer offen gehalten: Versuchsgruppe 3: freipräprierter Unterkieferwinkel nach Erstellen des *critical size defect* und Reimplantation des zerkleinerten autologen Knochentransplantates.



**Abbildung 5:** Ratte intraoperativ; OP-Bereich durch Wundspreizer offen gehalten; freipräprierter Unterkieferwinkel nach Erstellen des *critical size defect*; A: Versuchsgruppe 1, Raspatorium mit makroporöser Folie lingual unter Unterkieferwinkel mit *critical size defect* vorgeschoben; B: Versuchsgruppe 4, Kollagenscaffold nach 14-tägiger Kultivierung mit ADSC (*adipose derived stem cells*) in *critical size defect* im Bereich des Unterkieferwinkels transplantiert.

#### 3.2.3. Postoperative Phase

Den Tieren wurde 1,5h nach initialer Narkosegabe 0,2ml/kg KG Antisedan® (1 mg/kg KG Atipamezolhydrochlorid, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) zur Antagonisierung subcutan, sowie 10 ml/kg KG 5 %-ige Glucoselösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Die Körpertemperatur der Tiere wurde während der Narkose und in der

Aufwachphase durch Wärmekissen bzw. Wärmelampe konstant gehalten. Über 3 Tage wurden die Tiere analgetisch mit 0,4 ml/kg KG Metacam® (2 mg/kg KG Meloxicam, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein, Deutschland) subcutan versorgt. Gefüttert wurden die Tiere täglich mit frisch in Wasser eingeweichten Futterpellets Altromin 1324 TPF Haltungsdiät für Ratten und Mäuse Alleinfuttermittel für Versuchstiere total pathogenfrei vakuumiert und Hundefutter nass der Marke Pedigree Pur reich an 5 Sorten Fleisch (Mars GmbH, Verden, Deutschland), beides ad libidum. Weiterhin stand den Ratten Wasser in Nippeltränken ad libidum zur Verfügung. Die Ratten wurden täglich einer Gewichtskontrolle unterzogen und ihr Allgemeinbefinden beurteilt.

#### 3.2.4. Standzeiten und Versuchsabschluss

Die Tiere wurden nach Ablauf der 8. postoperativen Woche mittels CO<sub>2</sub>-Applikation in einem abgedichteten Gefäß getötet. Durch die Inhalation des Gases werden die Tiere innerhalb weniger Sekunden bewusstlos und erliegen innerhalb einer Minute einem Atem- und Kreislaufstillstand. Nach der Euthanasie wurden die Unterkiefer entnommen und zur Fixierung für die weiteren histologischen und computertomographischen Untersuchungen in 50 ml Falcon Röhrchen mit 30 ml gepuffertem Formaldehyd 4% gegeben.

### 3.3. Auswertung des in vivo Versuchs

Die Defektregionen wurden sowohl qualitativ, wie auch quantitativ auf die Knochenneubildung hin untersucht. Zum einen wurden die Tiere während ihrer Standzeit am Tag der Operation und nach 1, 2, 4 und 8 Wochen postoperativ mit 0,2 ml/kg KG Domitor® sediert und in einem hochauflösenden *flat-panel* Volumen Computertomographen (fpvCT) untersucht, anschließend wurde den Tieren 0,2ml/kg KG Antisedan® verabreicht. Um die Unterkieferproben histologisch zu untersuchen, wurden sie in 4% Formaldehyd fixiert und in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht.

#### 3.3.1. Flat-panel Volumen Computertomograph (fpvCT)

Die Abteilung Neuroradiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen betreibt den eXplore Locus Ultra (Abbildung 6). Dieses fpvCT ist ein hochauflösendes CT-System (GE Global Research, Niskayuna, New York, USA) mit einem amorphen Silizium *flat-panel* zur Strahlendetektion. Dieses Gerät war der erste speziell für Kleintiere ausgewiesene Scanner, welcher die *flat-panel* Technologie nutzt. Bei konventionellen Tomographen werden Detektorringe angewendet, deren kleinste Bauelemente zur Strahlendetektion größer sind als bei einem fpvCT. Daraus resultiert eine

### 3. Material und Methoden

---

verbesserte Auflösung von Hartgewebe wie Knochen im fpvCT gegenüber anderen Computertomographen. Der Flächendetektor ist einer Röntgenröhre gegenüberliegend auf einer rotierenden optischen Bank (Gantry) montiert und besitzt eine  $1024 \times 1024$  Pixel Matrix, die ca.  $23 \times 23$  cm groß ist. Die Detektoren bestehen aus einer Schicht photosensitivem, amorphem Silizium, auf die Caesiumjodid-Kristalle aufgelagert sind (Verhoff et al. 2008). Das fpvCT benutzt einen Jedi 42 Generator und eine Solarix Röntgenstrahlröhre (Obert et al. 2010).

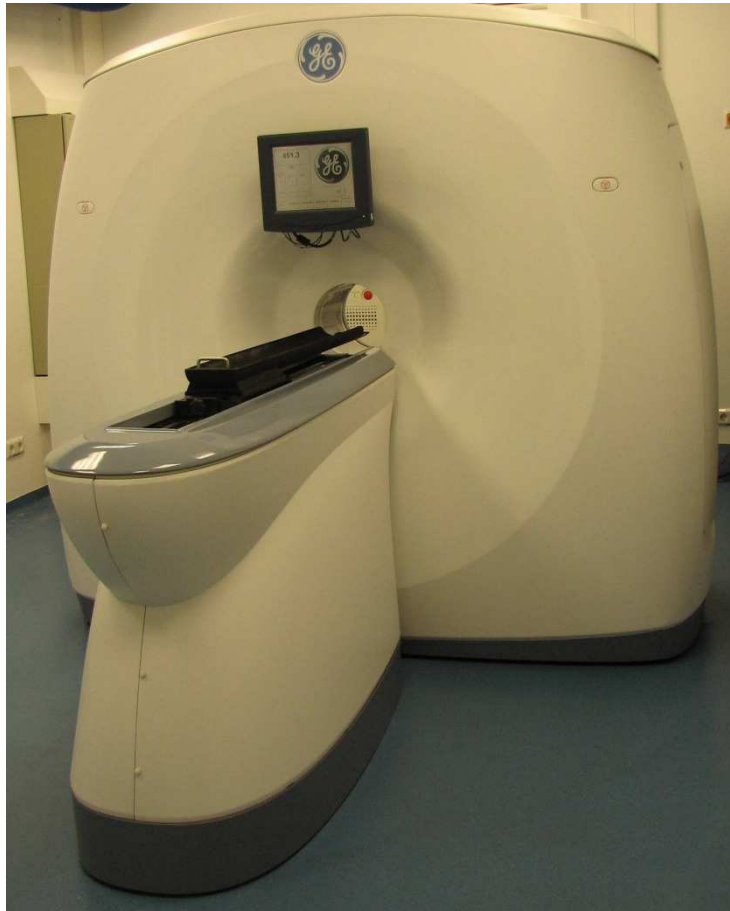
Die Funktion des Detektors besteht darin, die auftreffende Röntgenstrahlung in ein elektrisches Signal umzuwandeln, zu verstärken und von einem analogen Signal in ein digitales umzuwandeln. Zwischen Strahlenquelle und Detektor befindet sich das Untersuchungsobjekt. Bei den in dieser Studie angewendeten Untersuchungsprotokollen rotiert die Gantry während einer Untersuchung mit Rotationszeiten von 1 Sekunde. Während einer Rotation werden 1000 Einzelprojektionsbilder aufgenommen. Aus diesen Projektionsbildern werden anschließend dreidimensionale Bilddaten errechnet. Diese Bilddaten setzen sich aus einzelnen isotropen Volumenelementen (Voxeln) mit einer Kantenlänge von 0,60 mm bis zu 0,05 mm zusammen. Die konkrete Größe wird während der Bildrekonstruktion festgelegt und ist abhängig vom Untersuchungsvolumen. Die isotropen Voxel der erzeugten Datensätze erlauben bei der Auswertung der Bilddaten eine exakte Volumetrie von Skelettanteilen. Rotationen von dreidimensionalen Bildvolumen und das Anfertigen von Schnittbildern in beliebigen räumlichen Ebenen können besonders akkurat durchgeführt werden, was die Befundung und Auswertung erleichtert. Knochenveränderungen können sehr gut dargestellt werden. Das System wird vor allem in der Kleintierforschung bei Mäusen und Ratten eingesetzt. Ein besonderer Vorteil des fpvCT in der experimentellen Kleintierforschung ist, dass man die Untersuchung am lebenden Tier über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten wiederholen kann. Durch die kurzen Untersuchungszeiten von nur 8 Sekunden reicht eine kurze Sedierung der Tiere aus, um eine Ruhestellung auf dem Untersuchungstisch während der Untersuchung sicher zu stellen. Durch diese Vorteile kann in vivo Knochenheilung sehr gut verfolgt und dokumentiert werden.

Das in einer Gantryrotation ermittelbare Messfeld ist auf  $16 \times 16 \times 5$  cm<sup>3</sup> bei den in dieser Studie genutzten Untersuchungsprotokollen festgelegt. Der Messfelddurchmesser des Scanners wurde damit an die am häufigsten genutzten Größenverhältnisse der Versuchstiere angepasst (Obert und Gizewski 2011; Schulte-Geers et al. 2011). Die Untersuchung der Ratten fand in Sequenzen mit einer Röhrenspannung von 140 kVp und einem Anodenstrom von 10 mA statt. Die Rekonstruktion der Schnittbilder fand mit Hilfe eines cone-beam Algorithmus und einem standard

### 3. Material und Methoden

---

Rekonstruktionskernel statt. Die Daten wurden mit einer Voxelgröße von 50  $\mu\text{m}$  isometrischer Kantenlänge rekonstruiert. Die Bildrekonstruktion wurde mit einem auf Linux basierenden PC-*cluster* durchgeführt, bestehend aus einem „*master*“ und 8 „*nodes*“, die jeweils mit dual 3,06-GHz-Xeonprozessoren und 2-GB-RAM ausgestattet sind. Die Rekonstruktionszeit für die Bilddatenvolumen betrug etwa 12 Minuten. Anschließend wurden die Daten mit der Software MicroView 2.1.2 (GE Health Care, New York, USA) und OsiriX Imaging Software 3.8.1 64 bit (Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz) bearbeitet und ausgewertet.



**Abbildung 6:** *Flat-panel* Volumen Computertomograph eXplore Locus Ultra (GE Global Research, Niskayuna, New York, USA) in Grundstellung, automatisch fahrbarer Probentisch und Touchscreen.

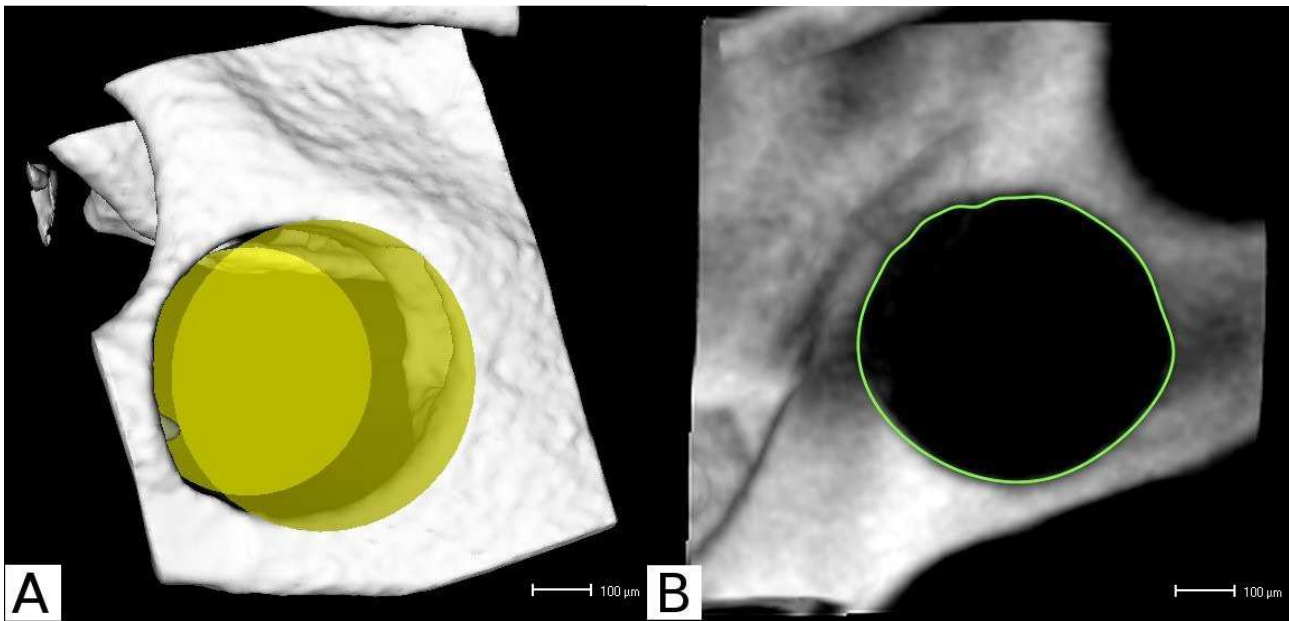
#### 3.3.2. Auswertung der Daten des fpvCT

Die Auswertung mit der Software MicroView fand ausschließlich auf einem MacPro (Modell Identifizierung: Mac Pro 4.1) mit einem Quad Core Intel Xeon 2,93 Ghz Prozessor und 8 GB Arbeitsspeicher statt (Seriennummer: CK95007C4PD). MicroView ermöglichte es, das spezielle Dateiformat der rekonstruierten Schnittbilder automatisch einzulesen und als DICOM-Datensatz

(*digital imaging and communications in medicine*) zu exportieren. Die DICOM-Datensätze können mit MicroView sowohl als 2 dimensionale Schnittbilder wie auch 3 dimensionale Volumenansichten betrachtet und analysiert werden. In einem ersten Schritt werden die Defekte großzügig in einer interessierenden Region (*region of interest*; ROI) isoliert. Da es sinnvoll ist, das primäre Sichtfeld an die Defektregion anzupassen, um so eine möglichst große Bildauflösung zu erreichen. Auf diese Weise konnte eine hohe räumliche Auflösung gewährleistet werden. Die knöcherne Struktur der Defektregion wurde 3 dimensional visualisiert. Der Absorptionsgrad der Röntgenstrahlung wird in der Computertomographie in Grauwerten dargestellt. Alle Voxel mit einem Grauwert von mehr als 1300 wurden in die Berechnung der 3 dimensional Darstellungen einbezogen. Der Grauwert von 1300 als Grenze für Knochengewebe wurde vorher an Probemessungen für Knochengewebe empirisch ermittelt. Die Grauwertstufen des fpvCT sind mit den Hounsfield-Einheiten (HU) von konventionellen CT-Geräten nicht direkt vergleichbar. Die Oberflächenkomplexität und Oberflächendetails wurden mit den Einstellungen *surface quality factor*: 100 und *decimation factor*: 0 maximal ausgenutzt. Eine exakte Positionierung der ROI konnte nur in 3 dimensionaler Darstellung der Defektregion verwirklicht werden. Die z-Ebene wurde parallel zum Defekt ausgerichtet, da sich die ROI ausschließlich in Abhängigkeit zur z-Ebene positionieren ließ. Die zylindrische ROI wird mit einem Durchmesser von 5 mm erzeugt und passgenau in den Defekt eingesetzt (Abbildung 7). Der Abstand der ROI zum Margo ventralis und caudalis wurde bestimmt. So konnte die Position der ROI in jeder Ebene auch in den späteren VCT-Aufnahmen exakt bestimmt werden, um einen vergleichbaren Verlauf über acht Wochen erfassen zu können. Von der zylidrischen ROI wurde ein Histogramm erstellt, in dem die Grauwerte der einzelnen Voxel, welche sich in der ROI befinden angezeigt werden. Voxel mit Grauwerten ab 1300 wurden als Knochen gewertet und deren Volumen addiert.

Mit der Software OsiriX in der Version 3.8.1 können DICOM-Dateien dargestellt und verarbeitet werden. Die einzelnen zweidimensionalen Schnittbilder der Defektbereiche wurden in OsiriX mit Hilfe der Funktion „*thick slab*“ übereinander gelegt und die Fläche der nicht verknöcherten Region des *critical size defect* mittels einer zweidimensionalen ROI bestimmt (Abbildung 7). Über die so ermittelte nicht ossifizierte Defektfläche konnte zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten prozentual, die im Laufe der 8 Wochen ossifizierte Defektfläche der Defektregion ermittelt werden, um eine Aussage über die funktionelle Ausrichtung des neu gebildeten Knochenmaterials und damit der Stabilität im Defektbereich machen zu können.





**Abbildung 7:** A: 3 dimensionale Rekonstruktion der flat panel Volumen Computertomographie Schnittbilder mit Hilfe der Software Micro View 2.1.2 (GE Health Care, New York, USA) im Bereich des Rattenunterkieferwinkels nach Erstellen des *critical size defect*, gelbe zylindrische region of interest *im critical size defect* mit deren Hilfe man die Volumenberechnung durchführte; B: flat panel Volumen Computertomographie, Schnittbilder mit der Funktion Thick slab der Software OsiriX Imaging Software 3.8.1 64 bit (Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz) übereinander gelegt und Bestimmung der ossifizierten Defektfläche mit Hilfe einer zweidimensionalen region of interest (grün).

#### 3.3.3. Histologische Untersuchung des in vivo neu gebildeten Knochens

Die Anfertigung der histologischen Schnittpräparate wurde im Labor des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Alle Substanzen und Lösungen zur Herstellung der Präparate wurden mit allgemein üblichen Methoden im Labor hergestellt oder über die Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die entnommenen Rattenunterkiefer wurden in gepufferter Formaldehydlösung 4% für 2 Wochen fixiert. Anschließend wurden die Unterkiefer mit Hilfe von EDTA-Lösung 20% bei Raumtemperatur 5-7 Tage unter ständigem Schütteln entkalkt. Um Knochengewebe, verkalktes Gewebe und Zähne schneidbar zu machen, müssen die eingelagerten Mineralsalze vollständig herausgelöst werden. Dieser Prozess wird als Entkalkung oder Entmineralisation bezeichnet (Mulisch und Welsch 2009). Nach der Entkalkung des Knochengewebes wurde eine Entwässerung durchgeführt. Hierfür wurde zuerst das Fixierungsmittel mit Wasser ausgewaschen. Danach erfolgte die eigentliche Entwässerung mit einer



### 3. Material und Methoden

---

in der Konzentration aufsteigenden Ethanolreihe. Es folgte eine Inkubation in einem Intermediärmedium (Xylol). Das gesamte Protokoll wurde in einem Gewebeentwässerungs- und Einbettautomaten Tissue Tek VIP 5 Jr. (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 5). Anschließend wurden sie mit Hilfe einer Paraffinausgießkonsole Tissue-Tek TEC 5 (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) in heißes Paraffin eingebracht. Zum Anfertigen der Schnitte wurde ein Rotationsmikrotom Leica RM2255 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) benutzt. Zuerst wurden die Paraffinblöcke auf -20°C gekühlt. Dann wurden pro Mandibulaseite 3 Schnitte von 3 µm Dicke in der Coronarebene rostral, mittig und caudal im Bereich der Defektregion angefertigt. Diese Schnitte wurden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt und glatt auf einen Objektträger aufgezogen, um für die histologische Untersuchung verwendet zu werden.

Zunächst wurde eine Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. In dieser werden saure Moleküle im histologischen Schnitt durch das blaue Hämatoxylin dargestellt, die Kerne erscheinen somit blau. Das Zytoplasma der Zellen und Kollagen werden nuanciert rot angefärbt. Die Färbung wurde unter einem standardisierten Protokoll mit einem Färbeautomaten VARISTAIN 24-3 (Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt (Tabelle 6).

Um die Knochenstrukturen noch besser beurteilen zu können und den reifen Knochen mit mineralisierter Knochenmatrix von noch unreifem, nicht mineralisiertem Knochen zu unterscheiden, wurden zusätzlich zur HE-Färbung im Färbeautomat unter einem standardisierten Färbeprotokoll eine Färbung nach Goldner (Modifikation der Massonschen Trichromfärbung nach Goldner) (Tabelle 7) und eine Masson-Trichrom-Färbung angefertigt (Tabelle 8). Bei der Goldner Färbung erfolgt eine Kernfärbung mit Eisenhämatoxylinlösung. Eine einfache Hämatoxylinfärbung ist nicht möglich, da die Kerne durch die sauren Lösungen im weiteren Verlauf wieder entfärbt würden. Anschließend setzt man Farbstoffe ein, die sich in ihrer Molekülgröße unterscheiden. Die feindisperse Phase (Phosphorwolframsäure-Orange-G) dringt schnell in alle Strukturen ein, die grobdisperse Phase (Lichtgrün) dringt langsamer ein und färbt zunächst nur die groben Strukturen an. Dabei wird die feindisperse Phase überfärbt. Man unterbricht die Färbung, bevor die grobdisperse Phase alle Strukturen durchdrungen hat, da es sonst zu einer Überfärbung kommt. Die Zellkerne färben sich mit dieser Färbemethode bräunlich-schwarz an, während sich das Zytoplasma sowie das Muskelgewebe ziegelrot hervorheben. Bindegewebe und unreifes Knochengewebe stellt

sich blaßgrün im Gegensatz zu mineralisiertem Knochengewebe dar, welches leuchtend grün hervorsteht. Die Osteoidsäume werden rot gefärbt und Erythrozyten färben sich orangegelb an. Die Trichromfärbemethoden dienen nicht nur zur Darstellung der Kollagenfibrillen, sondern eignen sich auch zur Abgrenzung gegen Epithelgewebe und Muskulatur. Bei der Masson-Trichrom-Färbung färben sich die Zellkerne blau-schwarz bis grau-violett, Zytoplasma, Muskulatur, Fibrin und Erythrozyten rot bzw. Elastin hellrot und Kollagen, Basalmembran und Osteoid blau an (Mulisch und Welsch 2009). Die histologischen Proben wurden subjektiv im Bereich des *critical size defect* im Unterkiefer unter Beratung eines Veterinärpathologen auf Knochenneubildung beurteilt.

#### **3.3.4. Untersuchung des in vivo neu gebildeten Knochens mittels eines Mikro-CT**

Für die Analyse der Knochenstruktur des *critical size defect*, der Frakturheilung und der Neubildung einer trabekulären Defektüberbrückung ist die Micro-Computertomographie eine aussagekräftige Untersuchung. Man kann somit die durch die lichtmikroskopischen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse bestätigen und ergänzen.

Die Micro-computertomographischen Aufnahmen wurden am Medizinischen Zentrum für Radiologie, Sektion Experimentelle Radiologie des Universitätsklinikum Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Langheinrich durchgeführt.

Ein Mikro-Computertomograph ist in seinem Aufbau grundsätzlich mit den klinischen Computertomographen vergleichbar. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass Proben mit einer Ortsauflösung von wenigen Mikrometern abgebildet werden können und man eine Detailerkennbarkeit im mikroskopischen Bereich erzielt. Je kleiner die Probengröße, desto höher kann die Auflösung gewählt werden. Der maximale Probendurchmesser liegt bei 20 mm, bei höheren Objektgrößen können in der Bildberechnung Artefakte entstehen. Die Fokusgröße bestimmt die maximale Auflösung: Je kleiner der Fokus ist, desto geringer wird auch die Leistung der Röntgenröhre. Daraus ergeben sich für die Mikro-Computertomographie lange Messzeiten von bis zu mehreren Stunden, bei geringen Probengrößen. Die wichtigsten Komponenten eines Mikrotomographen sind Röntgenröhre, Probenmanipulator, hochauflösender Flächendetektor (*charge-coupled-device-array*) und die Rechneinheit zur Systemkontrolle und Datenverarbeitung. Im Gegensatz zur konventionellen Computertomographie rotiert im Mikro-Computertomographen das Untersuchungsobjekt auf einem Probenteller. Strahlungsquelle und Detektor bleiben hingegen stationär. Durch Rotieren der Probe in kleinen Winkelinkrementen werden Projektionsradiographien der gesamten Probe erzeugt. Die Anzahl der Radiographien ergibt sich

### 3. Material und Methoden

---

aus der Größe der Rotationsschritte. Die Strahlungsquelle ist eine Wolfram-Mikrofokusröhre, die bei Beschleunigungsspannungen von 20 bis 80 kV betrieben werden kann. Der Winkel des Strahlenbündels liegt bei 39°. Die erreichbare Fokusgröße beträgt 8 µm bei einer Leistung von 8 W. Das verwendete System basiert auf einer Kegelstrahlgeometrie. Die Gewebeprobe wird während der Rotation in ihrer Gesamtheit von der konusförmigen Röntgenstrahlung durchdrungen, die nach entsprechender Schwächung auf den Flächendetektor trifft. Durch die Kegelstrahlgeometrie entscheidet die Position der Probe zwischen Strahlenquelle und Detektor über die resultierende Vergrößerung: Je größer der Abstand zum Detektor ist, desto stärker ist die Vergrößerung. Als Röntgendetektor mit hoher räumlicher Auflösung dient eine Szintillatorschicht. Hier kommt es zu einer Umwandlung der Röntgenstrahlung in sichtbares Licht. Die Dichte jedes Voxels wird in einen Grauwert einer 16-bit-Skala umgewandelt. Ein interner Dual Pentium III Computer mit unter Windows NT laufender Software dient der Anlagensteuerung und Datenerfassung. Die kleinste erreichbare Pixelgröße wird mit unter 2 µm angegeben. Die zu untersuchende Gewebeprobe wird auf einen Probenhalter gebracht und dieser auf dem Drehteller des Scanners montiert. Über einen computergesteuerten Präzisionsprobenmanipulator wird die Gewebeprobe vertikal so positioniert, dass sie sich beim Scanvorgang vollständig im konusförmigen Röntgenstrahl befindet. Mit der variierbaren horizontalen Positionierung wird die Vergrößerung eingestellt.

Bei dem in dieser Studie zur Verfügung stehenden Mikro-Computertomographen (Abbildung 8) handelt es sich um ein Gerät mit Kegelstrahlgeometrie und einer Mikrofokusröntgenröhre mit einer Fokusgröße von 8 mm (SkyScan, „SkyScan-1072 *high-resolution desk-top micro-CT system*“, Aartselaar, Belgien).



**Abbildung 8:** Mikro-Computertomograph SkyScan-1072 high-resolution desk-top micro-CT system (SkyScan, Aartselaar, Belgien) mit Kegelstrahlgeometrie und einer Mikrofokusröntgenröhre mit einer Fokusgröße von 8 mm.

Die in 4% gepuffertem Formaldehyd fixierten Unterkieferproben wurden in der Medianen geteilt und um den Defektbereich auf eine Probengröße von maximal 1cm x 1cm x 1cm zugeschnitten, um eine maximale Ortsauflösung zu erreichen. Die Untersuchungen wurden bei einer Röhrenspannung von 75 kV und einem Röhrenstrom von 91  $\mu$ A durchgeführt. Die Probe wurde während des Scanvorgangs in Rotationsschritten von 0,45° um insgesamt 180° gedreht. Aus den Projektionsradiographien wurden durchschnittlich 900 kontinuierliche Schnittbilder in axialer Richtung pro Unterkieferseite berechnet. Um die bestmögliche Bildqualität zu erreichen, wurde die höchstmögliche Matrix von 1024 x 1024 Bildpunkten (Pixeln) gewählt. Die Proben wurden mit einer kubischen Voxelgröße von 11  $\mu$ m<sup>3</sup> aufgenommen. Die resultierenden Schnittbilder wurden mit Hilfe der Software Analyze, Version 8.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) in 3D *maximum-intensity-projection* (MIP) dargestellt und bewertet.

#### 3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Beratung wurde von der AG Medizinische Statistik am Institut für Medizinische Informatik der Universität Gießen (Leiter: Dr. R.-H. Bödeker) durchgeführt. Die statistische Analyse des gebildeten Knochenvolumens im Defektbereich, sowie der ossifizierte Defektfläche erfolgte aufgrund der normalverteilten Daten parametrisch. Es wurden sowohl Mittelwert und Standardfehler (MW  $\pm$  S.E.M.) berechnet, wie auch gepaarte t-Tests der 5 Gruppen durchgeführt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die Datenanalyse wurde mittels SPSS Statistics

### 3. Material und Methoden

---

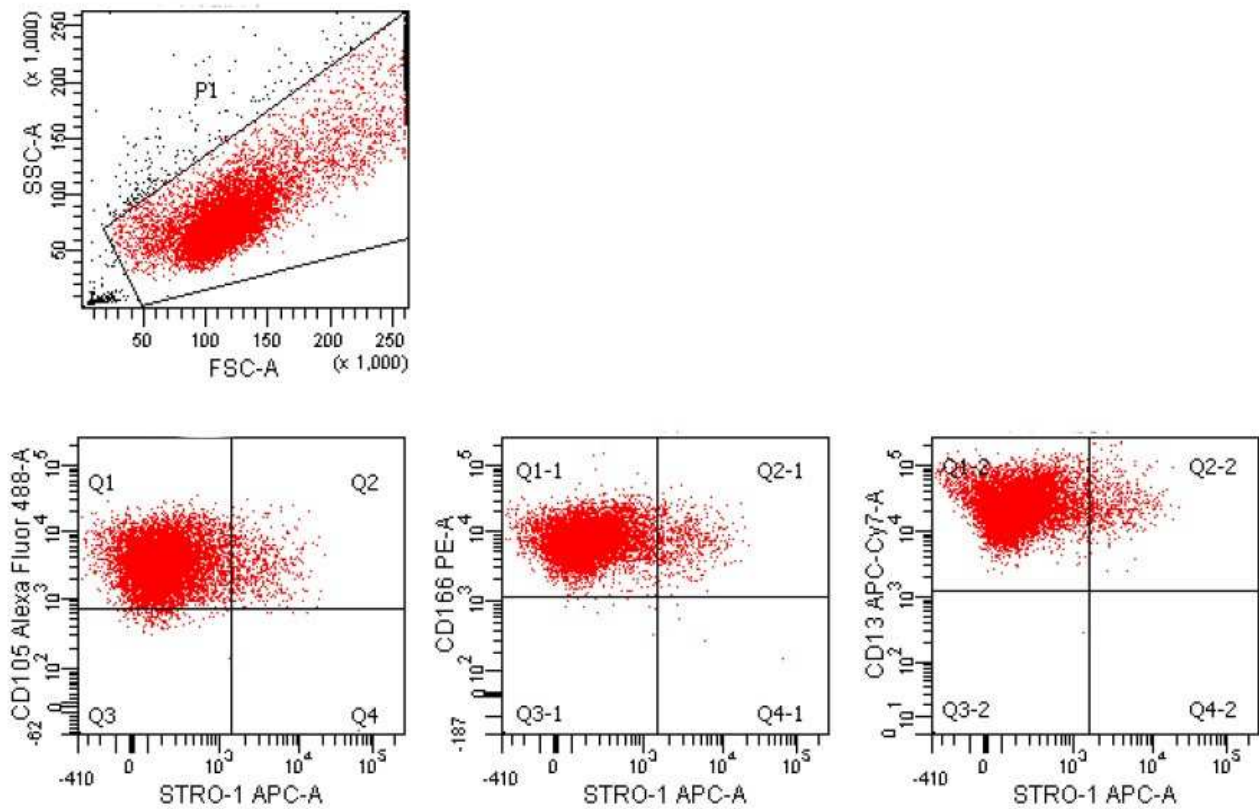
17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Das Layout der Darstellungen wurde mittels SPSS und GraphPad Prism für Windows 5.02 (GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt. In den Verlaufsdiagrammen sind *estimated marginal means* angegeben. In den *box and whisker plot* Diagrammen repräsentieren die *whisker* Minimum- und Maximumwerte und die *box* ist durch die 25% und 75% Quartile begrenzt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Durchflusszytometrische Analysen

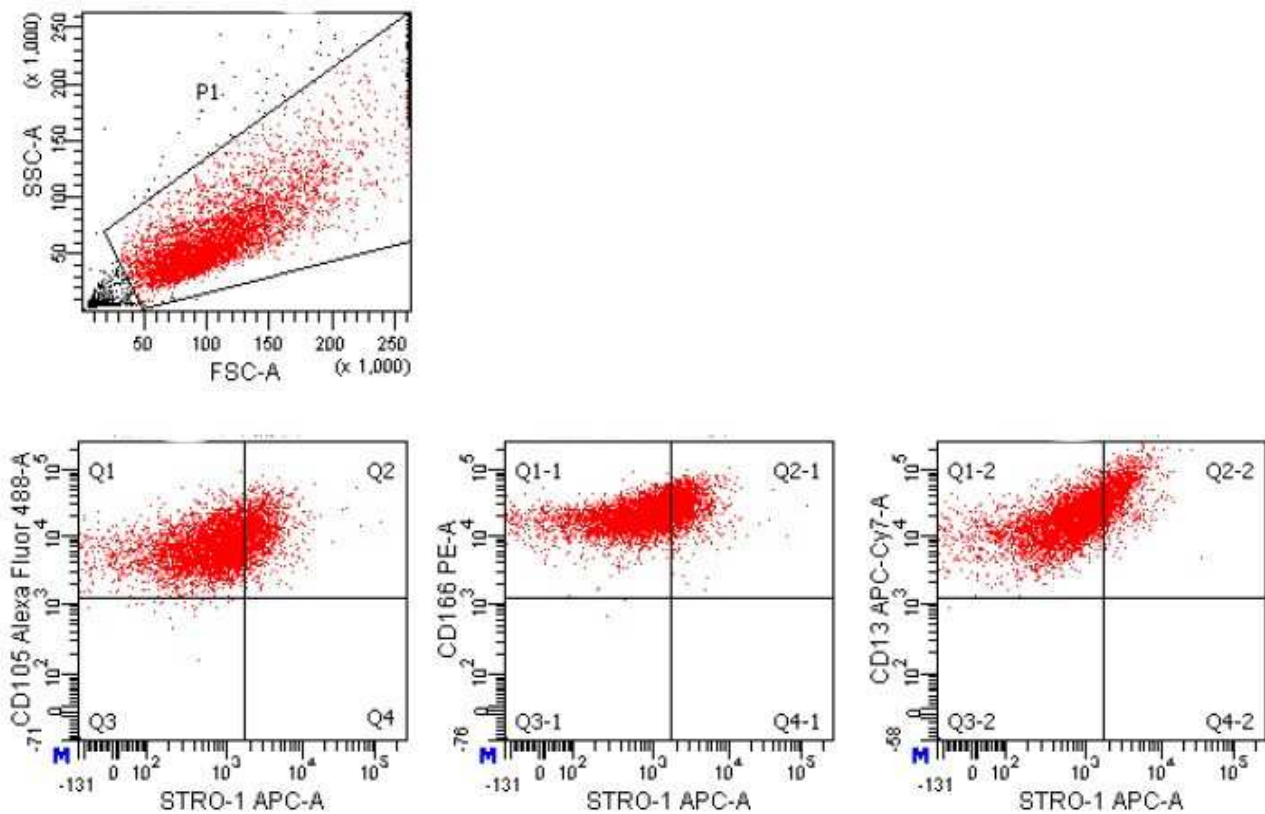
Es wurde auf 6 verschiedene Zelloberflächenmarker, welche in Kombination ein stammzellspezifisches CD-Muster (*cluster of differentiation*) ergeben, getestet. Da sich die Wellenlängen der Fluorochrome der Antikörper CD 49d und CD 166 zu stark überlappten, wurden zwei Proben angesetzt. Die durchflusszytometrischen Analysen der isolierten ADSC zeigten in Passage 3 wie auch in Passage 10 ein CD-Muster, welches auf Stammzeleigenschaften schließen lässt. Sowohl Zellen aus Passage 3 wie auch aus Passage 10 sind für die ADSC charakteristischen Marker CD 105, CD 166 und CD 13 positiv (Abb. 9 und 10). Der Anteil der STRO-1 Marker, CD117 Marker und CD49d Marker positiven Zellpopulationen steigt von Passage 3 zu Passage 10 an (Tabelle 2). Damit zeigten die untersuchten Zellpopulationen, bezüglich der überprüften Zelloberflächenmarker ähnliche CD-Muster, wie die ADSC, die von Zuk et al. (2002) (CD 105+, CD 13+, CD 49d+, STRO-1+), Gronthos et al. (2001) (CD 13+, CD 105+, CD 166+, CD 49+) und Lee et al. (2004) (CD 105+, c-kit (CD117)+) beschrieben wurden.

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 9:** Exemplarisches Punkt-Wolken Diagramm *fluoreszenz activated cell sorting* Analyse, *adipose derived stem cells* in Passage 3. 97,4% CD 105 Marker positive Zellen (Quartil 1 und 2), 99,8% CD 166 Marker positive Zellen (Quartil 1-1 und 2-1), 99,9% CD 13 positive Zellen (Quartil 1-2 und 2-2), STRO-1 positive Zellen (Quartile 2 und 4 (5,9%), 2-1 (5,8%), 2-2 (5,2%)).

#### 4. Ergebnisse



**Abbildung 10:** Exemplarisches Punkt-Wolken Diagramm fluoreszenz activated cell sorting Analyse, *adipose derived stem cells* in Passage 10. 99,3% CD (*cluster of differentiation*) 105 Marker positive Zellen (Quartil 1 und 2), 99,9% CD 166 Marker positive Zellen (Quartil 1-1 und 2-1), 99,9% CD 13 positive Zellen (Quartil 1-2 und 2-2), STRO-1 positive Zellen (Quartile 2 (26,2%), 2-1 (26,2%), 2-2 (26,3%)).



#### 4. Ergebnisse

Zelloberflächen- marker	Passage 3 (Marker positive Zellen in %)	Passage 10 (Marker positive Zellen in %)
CD 105	97,5	99,4
CD 166	99,8	99,9
CD 13	99,9	99,9
CD 117	6,5	54,1
STRO-1	5,5	26,2
CD 49d	3,0	24,9

**Tabelle 2** CD (*cluster of differentiation*) positive Zellen, prozentuale Ergebnisse sind Mittelwerte zweier durchflusszytometrischer Analysen von ADSC (*adipose derived stem cells*) in Passage 3 und Passage 10. Der Anteil der STRO-1 Marker (stromales Antigen 1), CD117 Marker und CD49d Marker positiven Zellpopulationen steigt von Passage 3 zu Passage 10 an

## 4.2. Aufnahmen des fpvCT

### 4.2.1. Knochenvolumen

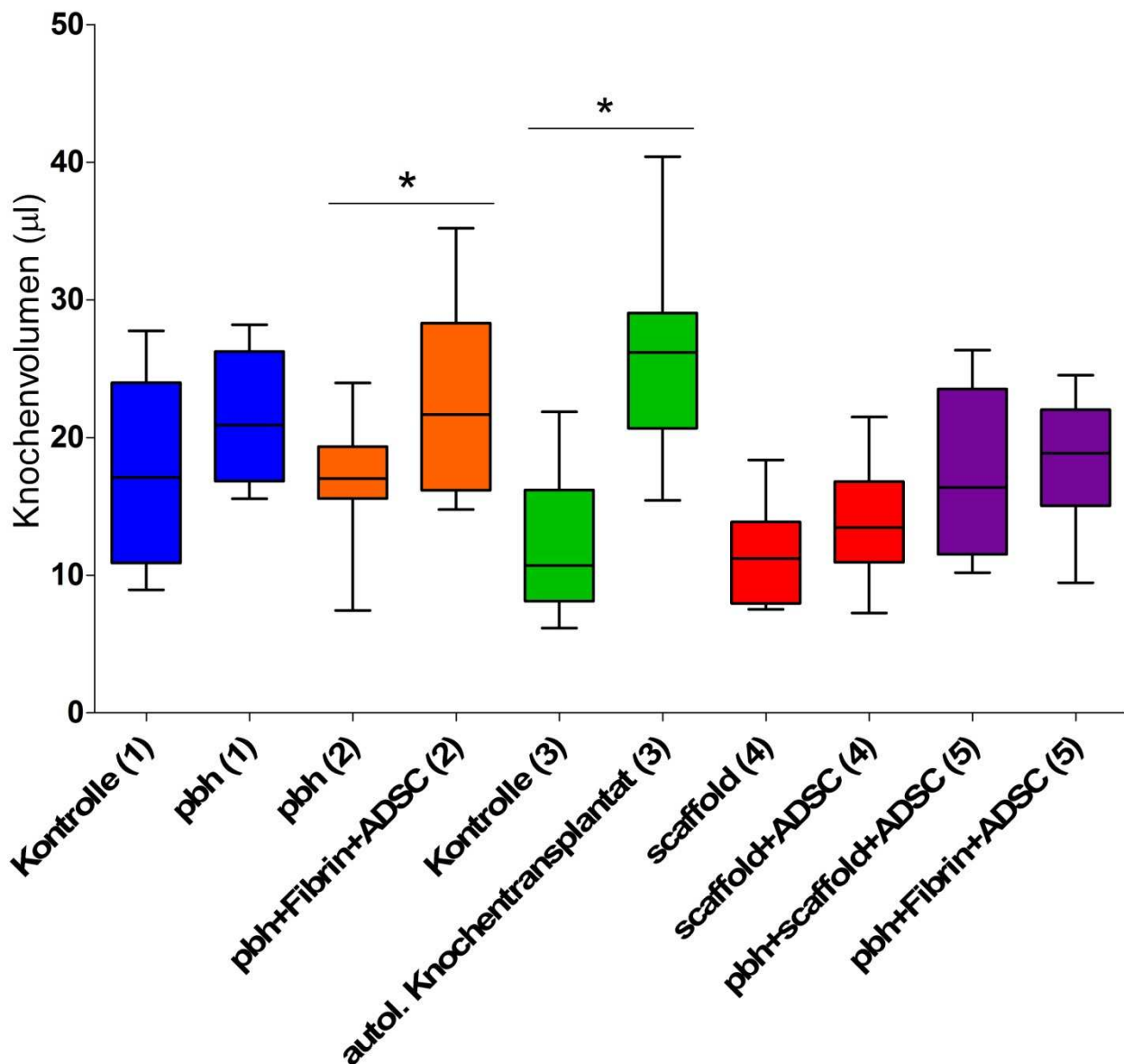
Es wurde bei jedem Tier eine Kontrolluntersuchung mittels fpvCT unmittelbar nach dem operativen Eingriff durchgeführt. Das im Defektbereich verbliebene Knochenvolumen wurde in  $\mu\text{l}$  berechnet. Es ergab sich ein Mittelwert über alle Therapiegruppen von  $0,93 \pm 0,10 \mu\text{l}$ , gesondert betrachtet wurde die Therapiegruppe mit autologem Knochentransplantat bei der sich ein Mittelwert von  $18,10 \pm 1,13 \mu\text{l}$  berechnen ließ. Das Knochenvolumen im *critical size defect* wurde 1, 2, 4, und 8 Wochen nach der Operation berechnet. Es wurde ein Vergleich der Versuchsgruppen welche im *split mouth* Design angeordnet waren nach 8 Wochen Heilungsphase durchgeführt. Es ließen sich folgende Ergebnisse beobachten: Im Vergleich der Versuchsgruppe 1 ist zu erkennen, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollseite und der pbh Seite zeigen ( $p=0,389$ ). Vergleicht man hingegen das neu gebildete Knochenvolumen der Gruppe 2 im Defektbereich, so sind signifikant bessere Ergebnisse in den Unterkieferseiten mit pbh und ADSC Transplantat in Fibrinkleber im Vergleich zur Seite mit ausschließlich pbh Therapie erzielt worden ( $p=0,015$ ). Auch in Gruppe 3 zeigt sich eine bessere Knochenregeneration bzw. ein guter Knocheneinbau im Defektbereich der Unterkieferseite mit autologem Knochentransplantat im Vergleich zur Kontrollseite ( $p=0,0003$ ). In Gruppe 4 wurde eine Therapie mit einem auf equinem Kollagen basierenden *scaffold* mit und ohne 14 tägiger Kultivierung mit ADSC getestet. Es wurden keine

#### 4. Ergebnisse

Unterschiede zwischen den Therapieseiten der Gruppe 4 festgestellt ( $p=0,132$ ). In Gruppe 5 konnten ebenfalls keine Unterschiede bezüglich des neu gebildeten Knochenvolumens im *critical size defect* zwischen der Therapieseite mit pbh und ADSC in Fibrinkleber und der Therapieseite mit pbh und *scaffold* mit ADSC Transplantat festgestellt werden ( $p=0,724$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 grafisch dargestellt. Zusätzlich zu den p-Werten wurden Mittelwert und Standardfehler berechnet (siehe Tabelle 3).

Versuchsgruppe	Therapie	KV: MW $\pm$ S.E.M.	n	p-Wert
1	Kontrolle	17,37 $\pm$ 3,22	5	0,389
	pbh	21,42 $\pm$ 2,23	5	
2	pbh	16,97 $\pm$ 1,40	10	0,015
	pbh+Fibrin+ADSC	22,37 $\pm$ 2,17	10	
3	Kontrolle	12,20 $\pm$ 1,60	10	0,0003
	autologes Knochentransplantat	25,73 $\pm$ 2,20	10	
4	<i>scaffold</i> +ADSC	13,81 $\pm$ 1,27	10	0,133
	<i>scaffold</i>	11,58 $\pm$ 1,11	10	
5	pbh+Fibrin+ADSC	18,26 $\pm$ 1,49	10	0,724
	pbh+ <i>scaffold</i> +ADSC	17,29 $\pm$ 1,84	10	

**Tabelle 3** Knochenvolumen (KV) im Mittelwert (MW) mit Standardfehler (S.E.M.) im *critical size defect* in  $\mu$ l der verschiedenen Versuchsgruppen, pbh (*protected bone healing*), ADSC (*adiposed derived stem cells*), *scaffold* (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber), n (Anzahl der Versuche), p-Werte der Versuchsgruppen.

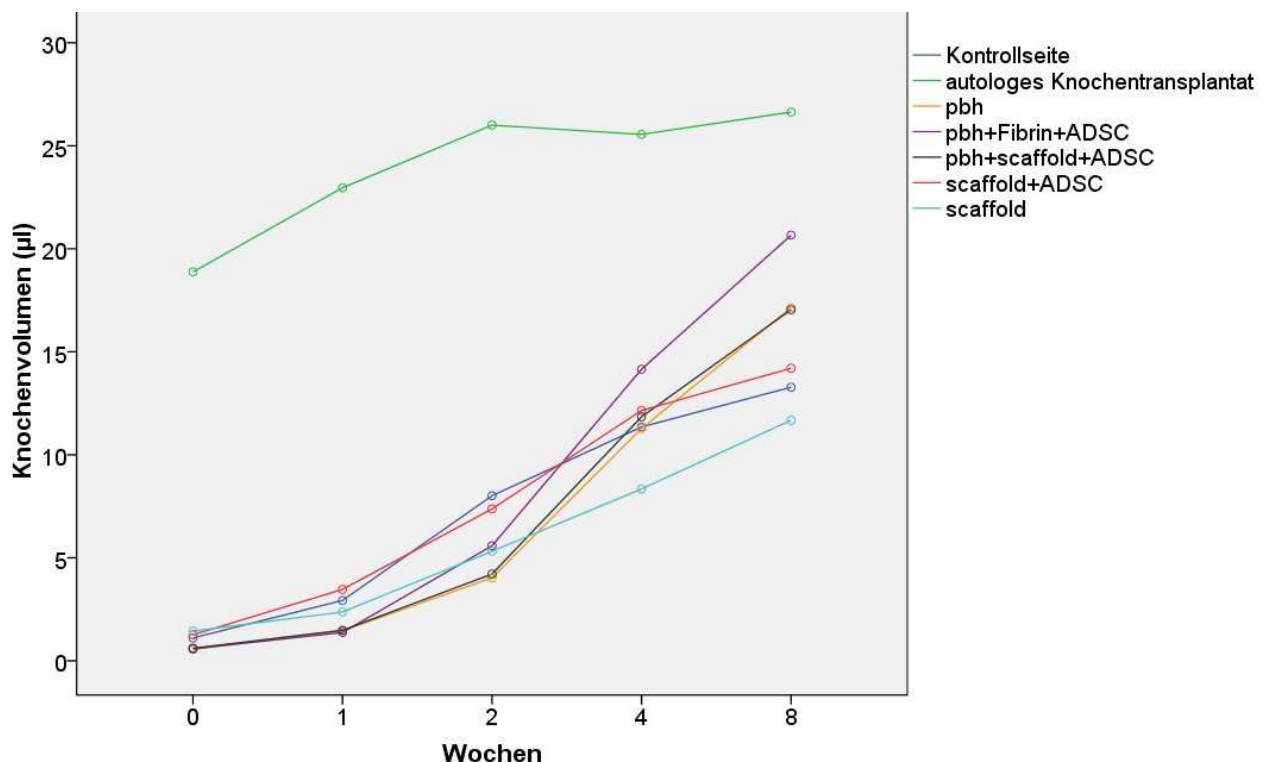


**Abbildung 11:** Box and whisker plot zum Vergleich des Knochenvolumens im *critical size defect* der verschiedenen Versuchsgruppen (Klammern) nach 8 Wochen Heilungsphase. Die Balken repräsentieren Minimum- und Maximumwerte, die Box wird durch das 25%-Quartil und das 75%-Quartil begrenzt, Mittelwert in Box eingezeichnet. \*=  $p \leq 0,05$  gepaarter t-Test. pbh (*protected bone healing*), ADSC (*adiposed derived stem cells*), scaffold (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber).

Das fpvCT ermöglichte es in vivo Aufnahmen der Rattenunterkiefer am Tag der OP und nach 1, 2, 4 und zum Endzeitpunkt nach 8 Wochen Heilungsphase durchzuführen. Somit konnte eine Verlaufskontrolle der Knochenvolumenzunahme und damit der Knochenregeneration durchgeführt

#### 4. Ergebnisse

werden, welche in Abbildung 12 dargestellt ist. Die Liniendiagramme der Kontrollgruppe, *scaffold*-Gruppe und *scaffold* mit ADSC Transplantatgruppe zeigen alle eine kontinuierliche Zunahme des Knochenvolumens innerhalb der 8 Wochen Heilungsphase. Bei den Liniendiagrammen der pbh Gruppe und den pbh Gruppen mit zusätzlichem ADSC Transplantat zeigt sich dagegen innerhalb der ersten 2 Wochen post OP eine geringe Steigung der Graphen und damit eine geringe Knochenregeneration, wohingegen zwischen der 2 und 4 Woche eine deutlich größere Steigung zu erkennen ist. Zwischen der 2. und 4. Woche übersteigt das Knochenvolumen der ADSC Transplantatgruppen das Knochenvolumen der Kontrollgruppe im *critical size defect*. Gesondert zu betrachten ist der Kurvenverlauf der Gruppe mit autologem Knochentransplantat. Das Volumen des Transplantats ist relativ groß und nimmt im weiteren Verlauf nur wenig zu. Es zeigt sich ein kontinuierlicher linearer Anstieg des Knochenvolumens bis zur 2. Woche post OP. Anschließend stagniert die Knochenvolumenzunahme.



**Abbildung 12:** Zunahme des Knochenvolumens in  $\mu\text{l}$  der verschiedenen Therapiegruppen, Kreise repräsentieren *estimated marginal means* der verschiedenen Therapiegruppen zu den computertomographischen Untersuchungszeitpunkten am OP-Tag und Woche 1, 2, 4 und 8 nach Operation. pbh (*protected bone healing*), ADSC (*adiposed derived stem cells*), scaffold (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber).

### 4.2.2. Ossifizierte Defektfläche

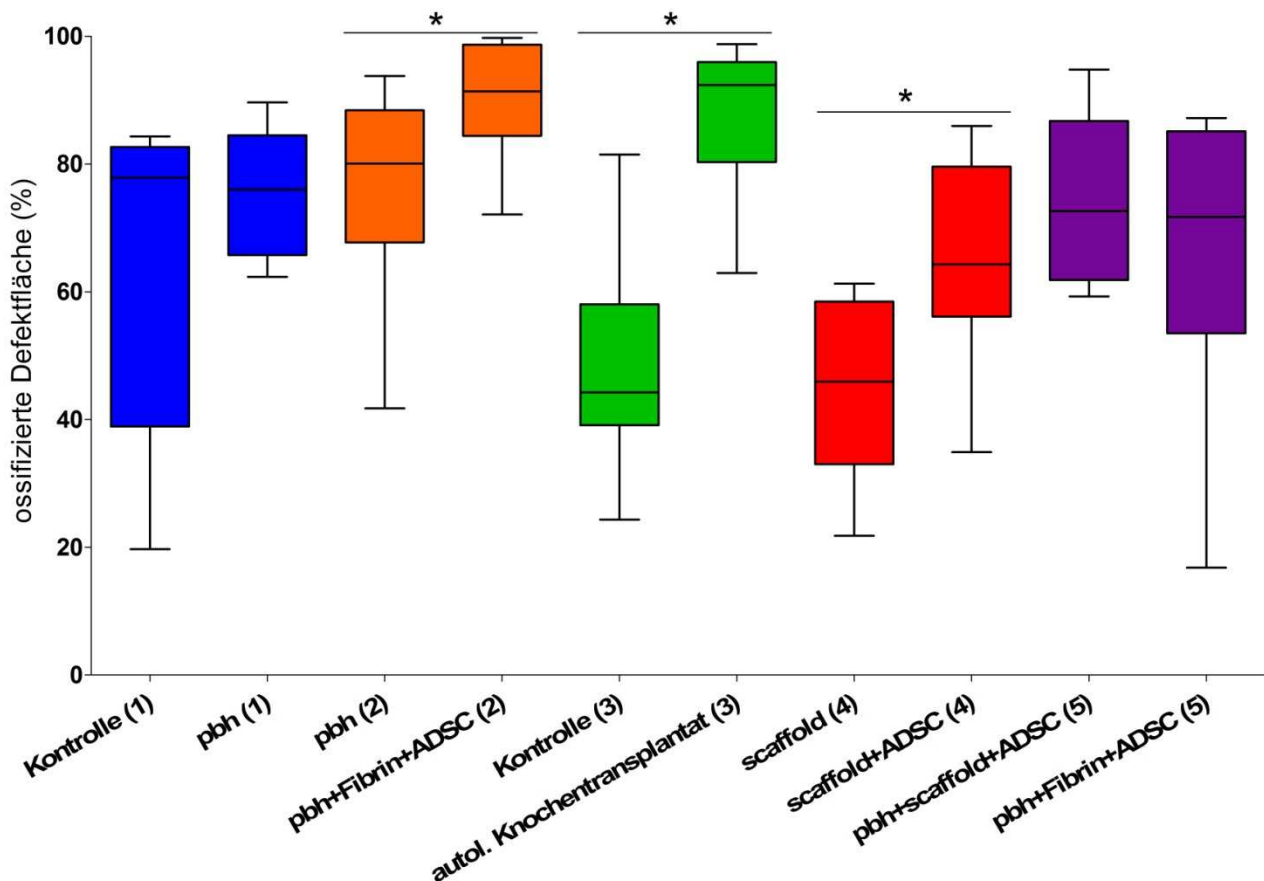
Nach dem operativen Eingriff wurde die ossifizierte Defektfläche der Therapiegruppe mit autologem Knochentransplantat in %-Anteilen berechnet. Hier ließ sich ein Mittelwert von  $81,02 \pm 2,32$  % berechnen. Neben dem Knochenvolumen wurde die ossifizierte Defektfläche des *critical size defect* berechnet. An den Ergebnissen kann man erkennen, dass die Neubildung von Knochenvolumen und die ossifizierte Defektfläche in engem Zusammenhang stehen. Bei der Berechnung der ossifizierten Defektfläche ergaben sich folgende Ergebnisse: Im Vergleich der Gruppe 1 ist zu erkennen, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollseite und der pbh Seite zeigen ( $p=0,502$ ). Vergleicht man hingegen die ossifizierte Defektfläche der Gruppe 2, so sind signifikant bessere Ergebnisse in den Unterkieferseiten mit pbh und ADSC Transplantat in Fibrinkleber im Vergleich zur Seite mit ausschließlich pbh Therapie erzielt worden ( $p=0,019$ ). Auch in Gruppe 3 zeigt sich ein signifikant größerer Ossifikationsbereich im Defekt mit autologem Knochentransplantat im Vergleich zur Kontrollseite ( $p=0,0001$ ). In Gruppe 4 wurde eine Therapie mit einem auf equinem Kollagen basierenden *scaffold* mit und ohne 14 tägiger Kultivierung mit ADSC getestet. Im Gegensatz zur Knochenvolumenberechnung ergaben sich bei der ossifizierten Defektfläche signifikant bessere Ergebnisse in der ADSC Transplantatgruppe ( $p=0,006$ ). In Gruppe 5 konnten keine signifikanten Unterschiede im *critical size defect* zwischen der Therapieseite mit pbh und ADSC in Fibrinkleber und der Therapieseite mit pbh und *scaffold* mit ADSC Transplantat festgestellt werden ( $p=0,419$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 grafisch dargestellt. Zusätzlich zu den p-Werten wurden Mittelwert und Standardfehler berechnet (siehe Tabelle 4). Mit den Ergebnissen der Flächenberechnung hat man nun eine Aussage über die funktionelle Ausrichtung des neu gebildeten Knochenmaterials und damit der Stabilität im Defektbereich machen können und die vorherige Knochenvolumenberechnung weitestgehend bestätigen.

#### 4. Ergebnisse

Versuchsgruppe	Therapie	OD: MW $\pm$ S.E.M.	n	p-Wert
1	Kontrolle	64,22 $\pm$ 12,02	5	0,502
	pbh	75,32 $\pm$ 4,63	5	
2	pbh	75,91 $\pm$ 5,21	10	0,019
	pbh+Fibrin+ADSC	90,18 $\pm$ 2,84	10	
3	Kontrolle	48,61 $\pm$ 5,51	10	0,0001
	autologes Knochentransplantat	88,42 $\pm$ 3,50	10	
4	scaffold+ADSC	64,75 $\pm$ 4,90	10	0,006
	scaffold	44,61 $\pm$ 4,40	10	
5	pbh+Fibrin+ADSC	66,87 $\pm$ 7,09	10	0,419
	pbh+scaffold+ADSC	74,38 $\pm$ 4,36	10	

**Tabelle 4** Ossifizierte Defektfläche in Prozent im Mittelwert (MW) mit Standardfehler (S.E.M.) im *critical size defect* der verschiedenen Versuchsgruppen, pbh (*protected bone healing*), ADSC (*adiposed derived stem cells*), scaffold (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber), n (Anzahl der Versuche), p-Werte der Versuchsgruppen.

#### 4. Ergebnisse

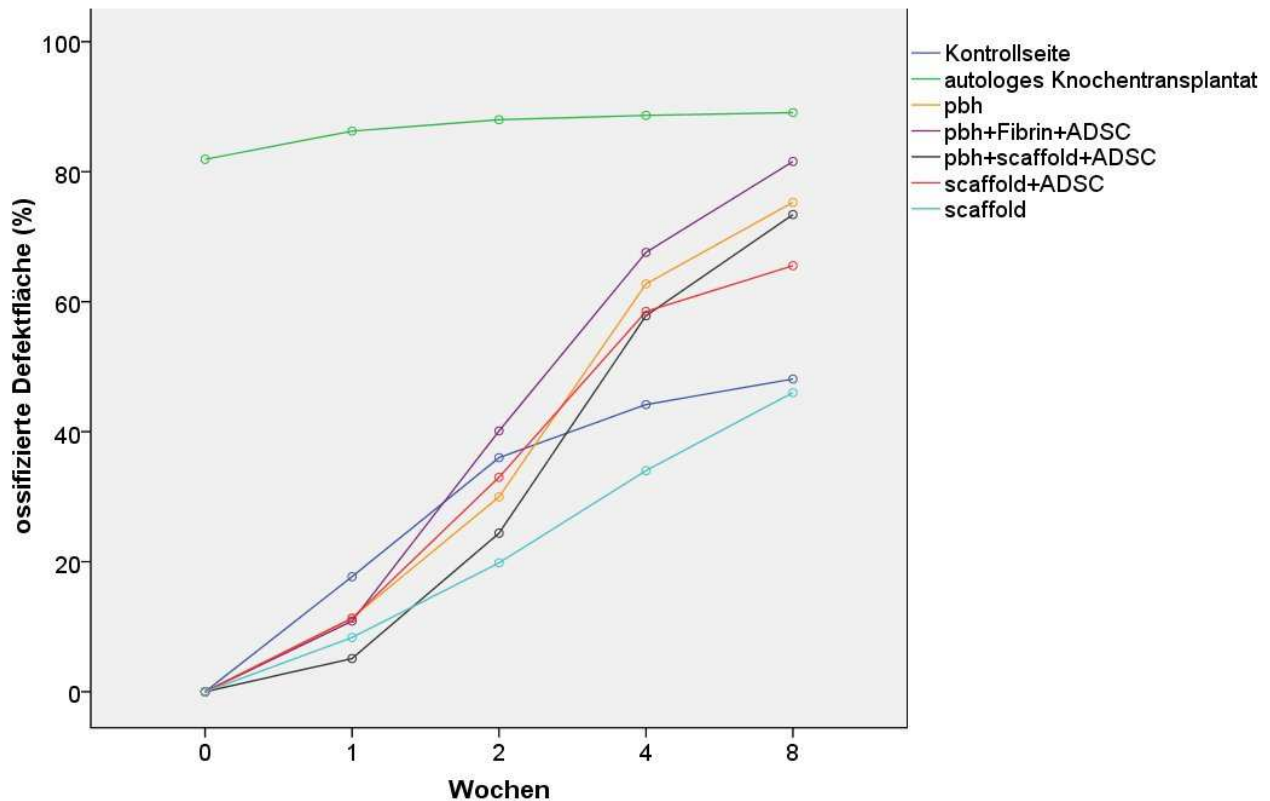


**Abbildung 13:** Box and whisker plot zum Vergleich der ossifizierten Defektfläche (Prozent) im *critical size defect* der verschiedenen Versuchsgruppen (Klammern) nach 8 Wochen Heilungsphase. Die Balken repräsentieren Minimum- und Maximumwerte, die Box wird durch das 25%-Quartil und das 75%-Quartil begrenzt, Mittelwert in Box eingezeichnet. \*=  $p \leq 0,05$  gepaarter t-Test. pbh (protected bone healing), ADSC (*adiposed derived stem cells*), scaffold (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber).

Die Verlaufskontrollen der ossifizierten Defektflächen sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Liniendiagramme aller Therapiegruppen zeigen eine kontinuierliche Zunahme der ossifizierten Defektfläche innerhalb der 8 Wochen Heilungsphase. Auch bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass die ossifizierte Defektfläche der ADSC-Transplantatgruppen zwischen der 2. und 4. Woche die der Kontrollgruppe übersteigt. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes nach 8 Wochen haben alle Liniendiagramme der unterschiedlichen Therapiegruppen, hier aber besonders der ADSC-Transplantatgruppen, sowohl bei der Knochenvolumenberechnung wie auch bei der Berechnung der ossifizierten Defektfläche eine hohe Steigung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die maximale osteogene Potenz der Transplantate nach 8 Wochen Heilungsphase noch nicht erreicht ist.

## 4. Ergebnisse

Gesondert zu betrachten ist der Kurvenverlauf der Therapiegruppe mit autologem Knochentransplantat. Man hat hier im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen schon zu Beginn autologes Knochenmaterial in den Defekt eingebracht und dadurch eine hohe knöcherne Durchbauung, welche während des gesamten Untersuchungszeitraumes bestehen bleibt.



**Abbildung 14:** Zunahme der ossifizierten Defektfläche (Prozent) der verschiedenen Therapiegruppen, Kreise repräsentieren *estimated marginal means* der verschiedenen Therapiegruppen zu den computertomographischen Untersuchungszeitpunkten am OP-Tag und Woche 1, 2, 4 und 8 nach Operation. pbh (*protected bone healing*), ADSC (*adiposed derived stem cells*), scaffold (Kollagenscaffold), Fibrin (Fibrinkleber).

### 4.3. Histologische Untersuchungen

In den histologischen Untersuchungen wurde eine subjektive Beurteilung der Qualität der Knochenregeneration im *critical size defect* der verschiedenen Therapiegruppen, mit besonderem Augenmerk auf die ADSC-Transplantatgruppen, durchgeführt.

In Gruppe 1 ist auf den Unterkieferseiten ohne Therapie des *critical size defect* wenig Knochenregeneration zu beobachten. Das umliegende Muskelgewebe ist in den Defekt vorgefallen und hat somit eine Knochenheilung in diesem Bereich erschwert, so dass ausschließlich in den Randbereichen der Defektzone eine Knochenneubildung möglich war (Abbildung 15). An den



#### 4. Ergebnisse

---

Defekträndern ist nur ein geringer Knochenaufbau zu beobachten (Abbildung 16). In den Defektbereichen mit pbh sind diese vor dem umgebenden Weichteilgewebe geschützt. Es sind deutlich die resorbierbaren makroporösen Folien, welche den Defekt vor Weichteilgewebsvorfall schützen, zu erkennen. Es findet eine Verknöcherung im Defektbereich statt, jedoch war in keinem der histologischen Schnitte eine komplette knöcherne Durchbauung des *critical size defect* zu erkennen. Die Knochenregeneration scheint von den Randbereichen des Defektes auszugehen. In 2 Präparaten mit *protected bone healing* bleibt eine Knochenregeneration aus. Eine Fusion der Kallusformationen der Randbereiche ist nicht erkennbar. Weiterhin ist Bindegewebe im Defektbereich zu finden (Abbildungen 17 und 18).

Die histologischen Untersuchungen der pbh Seiten der Gruppe 2 bestätigten die Ergebnisse von Gruppe 1. Die Unterkieferdefekte mit pbh und ADSC Transplantat in Fibrinkleber, zeigten eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich (Abbildung 19). Dies ist besonders in der Goldner-Färbung durch das tief grün gefärbte bzw. in der Masson-Trichrom-Färbung durch das tief blau gefärbte reife Knochengewebe mit vielen vitalen Osteozyten zu erkennen (Abbildung 20 und 21), es findet Knochenaufbau statt. Die Defektregionen sind mit Knochenmaterial durchbaut, was durch Lakunen und Osteoidbälkchen, als Merkmale einer desmalen Ossifikation, gekennzeichnet sind. In 8 Proben dieser Gruppe ist in der Defektmitte eine isolierte Knochenneubildung zu erkennen. Hier fällt eine zellreiche Umgebung der Ossifikationsinseln auf (Abbildung 21). Lediglich in einer Probe ist die Knochenregeneration im Defektbereich ausgeblieben und mit den Ergebnissen der Kontrolle ohne Therapie zu vergleichen.

In Versuchsgruppe 3 zeigt sich in den Defektbereichen ohne Therapie ein ähnliches Bild wie in Gruppe 1. Es fehlen Hinweise auf eine Verknöcherung im Defektbereich. Die autologen Knochentransplantate, welche auf der Gegenseite der Mandibula eingesetzt wurden, füllen den Defektbereich aus (Abbildung 22). Diese Knochenfragmente gehen keine knöchernen Verbindungen ein. Es zeigen sich an 3 Präparaten dieser Gruppe transplantierte Knochenfragmente an denen ein Knochenabbau zu erkennen ist.

Die Ergebnisse der Versuchsgruppe 4 zeichnen sich durch eine geringe Knochenbildung im Defektbereich aus. Auf der *scaffold*-Seite findet keine Knochenneubildung statt. Muskelgewebe ist in den Defektbereich vorgefallen und füllt diesen aus (Abbildung 23). Das *scaffold* wurde abgebaut, es konnten in 3 Proben Reste des Kollagenscaffolds nachgewiesen werden, in diesen Bereichen traten auch Fremdkörperriesenzellen auf (Abbildung 24). Auf den Gegenseiten der Mandibula wurden mit ADSC besiedelte *scaffolds* eingesetzt. Hier lässt sich ebenfalls ein massiver Prolaps des

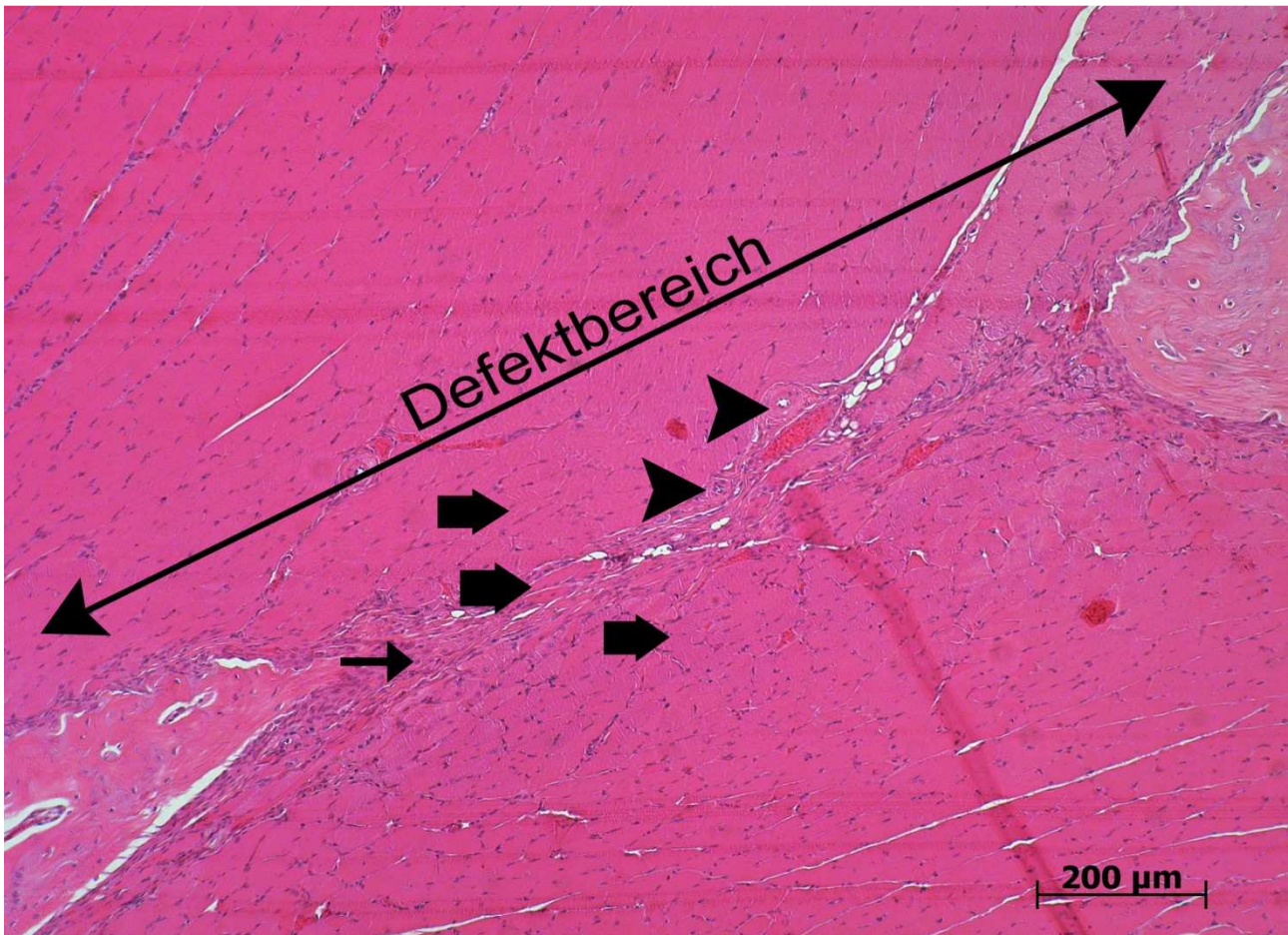
#### 4. Ergebnisse

---

umgebenden Muskelgewebes in den Defektbereich erkennen. Weiterhin sind in 7 Proben vermehrt Adipozyten im Defektbereich zu finden. Die erhoffte Platzhalterfunktion des Kollagenmaterials während der Knochenregeneration ist nicht eingetreten. Es ist eine Abrundung der Defektränder sichtbar mit Kallusbildung. Es konnte in 6 Proben eine isolierte Knochenneubildung in der Defektmitte nachgewiesen werden (Abbildung 24).

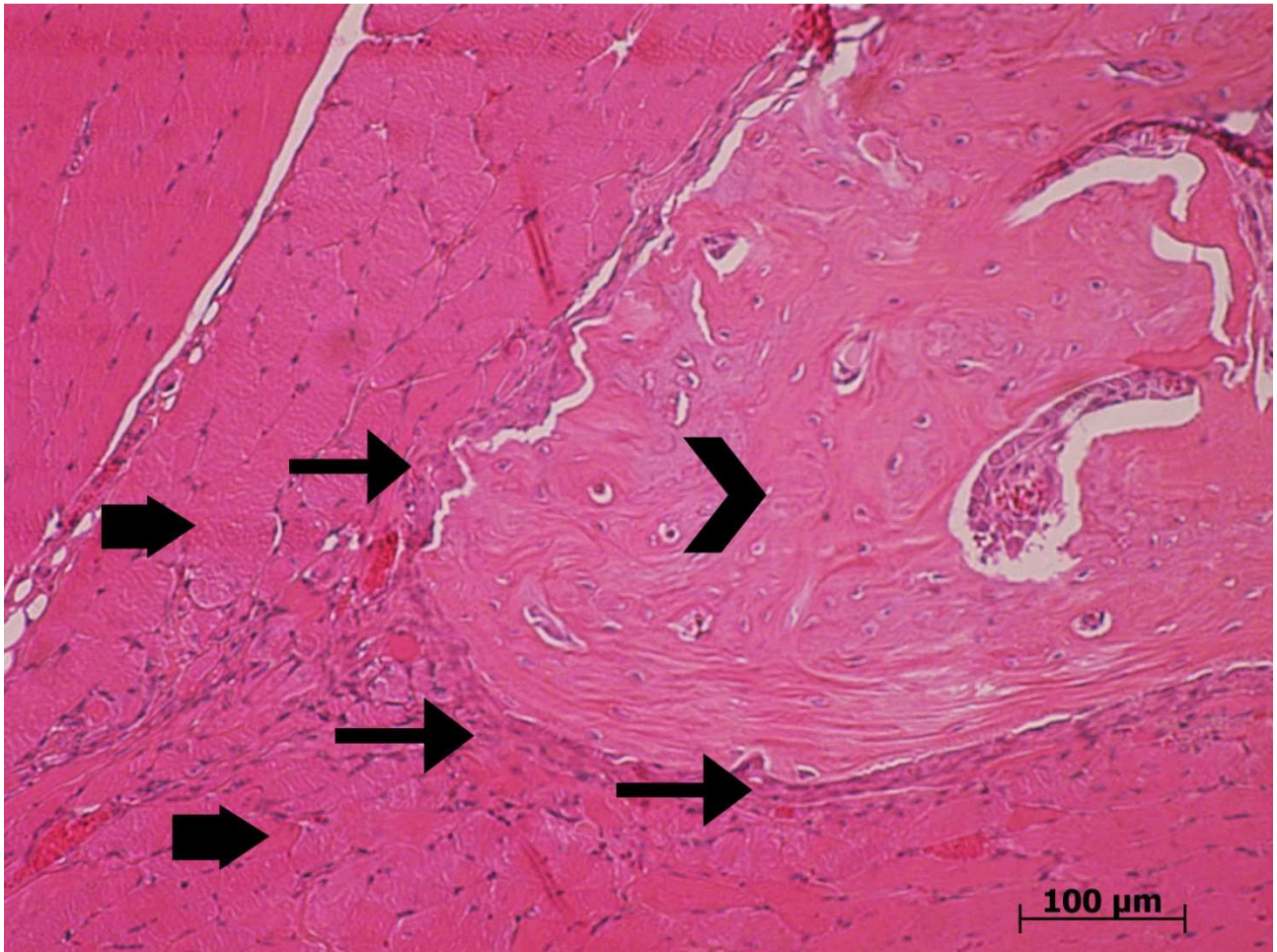
In Versuchsgruppe 5 findet man auf der Mandibulaseite mit pbh und ADSC Transplantat in Fibrinkleber ein ähnliches histologisches Ergebnis wie bei den Tieren in Gruppe 2. Auf der gegenüberliegenden Unterkieferseite mit pbh und *scaffold* mit ADSC-Transplantat sind bei 8 Proben die Defektregionen mit Knochenmaterial komplett durchbaut, was durch desmale Ossifikation gekennzeichnet ist (Abbildungen 25 und 27). In der Defektmitte sind bei diesen 8 Proben isolierte Knochenneubildungen zu erkennen (Abbildungen 26 und 27). Auch hier ist analog zu Gruppe 4 nur in 2 Proben Trägermaterial zu finden.

Zusammenfassend sind die qualitativ besten histologischen Ergebnisse bezüglich der Knochenrekonstruktion im *critical size defect* der Rattenmandibula in den Gruppen mit ADSC Transplantation und kombiniertem pbh erzielt worden. In allen Präparaten sowohl der Gruppen mit ADSC, aber auch der Gruppen ohne ADSC-Transplantationen fanden sich Adipozytenansammlungen im Defektbereich. Weiterhin war in den Defektbereichen eine Vielzahl an Blutgefäßen zu erkennen, dadurch war eine ausreichende Vaskularisierung der Transplantate vorhanden (Abbildung 19). Da in den Präparaten noch Knochenrekonstruktion mit Osteoblasten stattfindet, ist die maximale osteogene Potenz der Transplantate nach 8 Wochen Heilungsphase noch nicht erreicht.

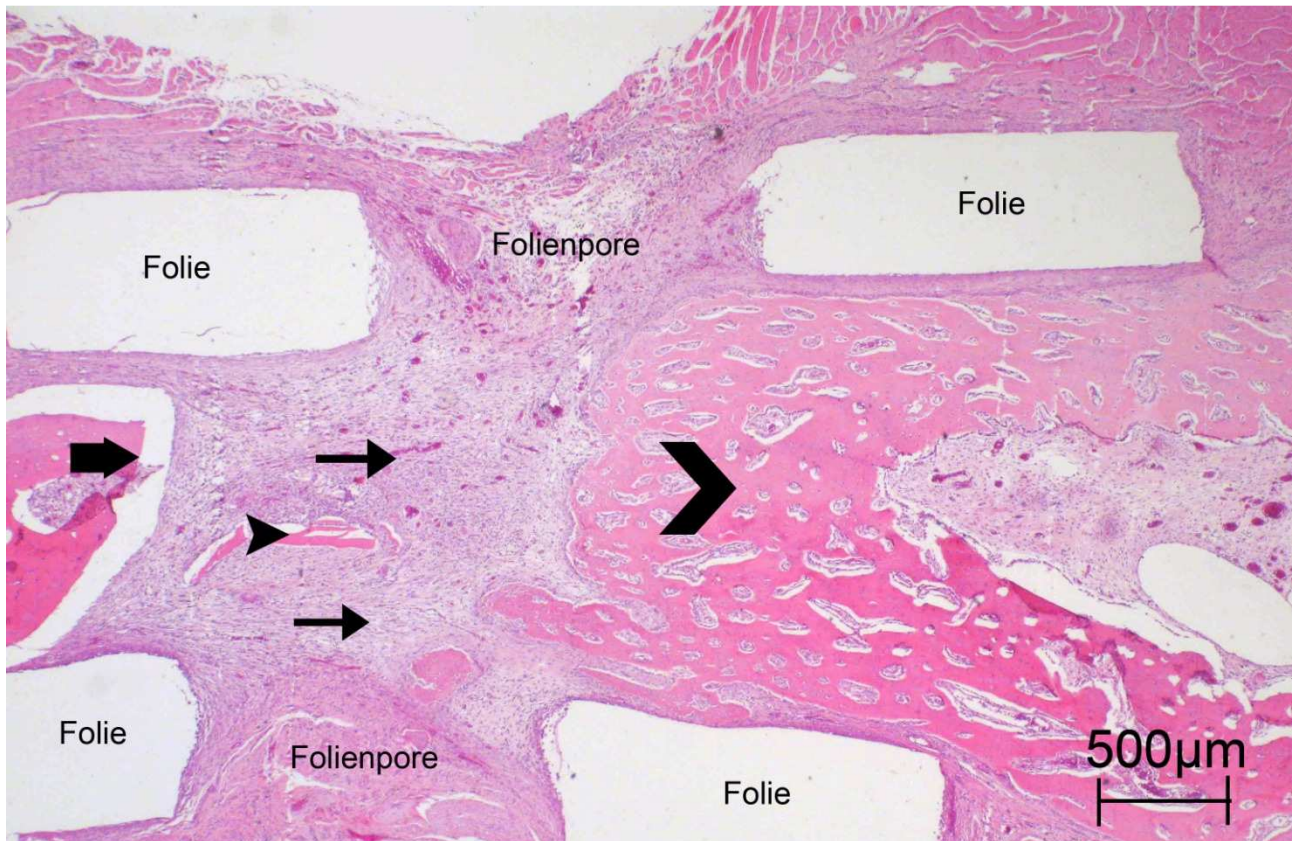


**Abbildung 15:** Gruppe 1 Kontrollseite ohne Therapie, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion. Muskelgewebe im Defektbereich (dicke Pfeile), Bindegewebe (dünner Pfeil), Gefäße (Pfeilspitzen); Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Im Defektbereich wenig Knochenregeneration zu beobachten. Das umliegende Muskelgewebe ist in den Defekt vorgefallen und hat eine Knochenheilung erschwert, ausschließlich in den Randbereichen der Defektzone ist eine Knochenneubildung möglich.



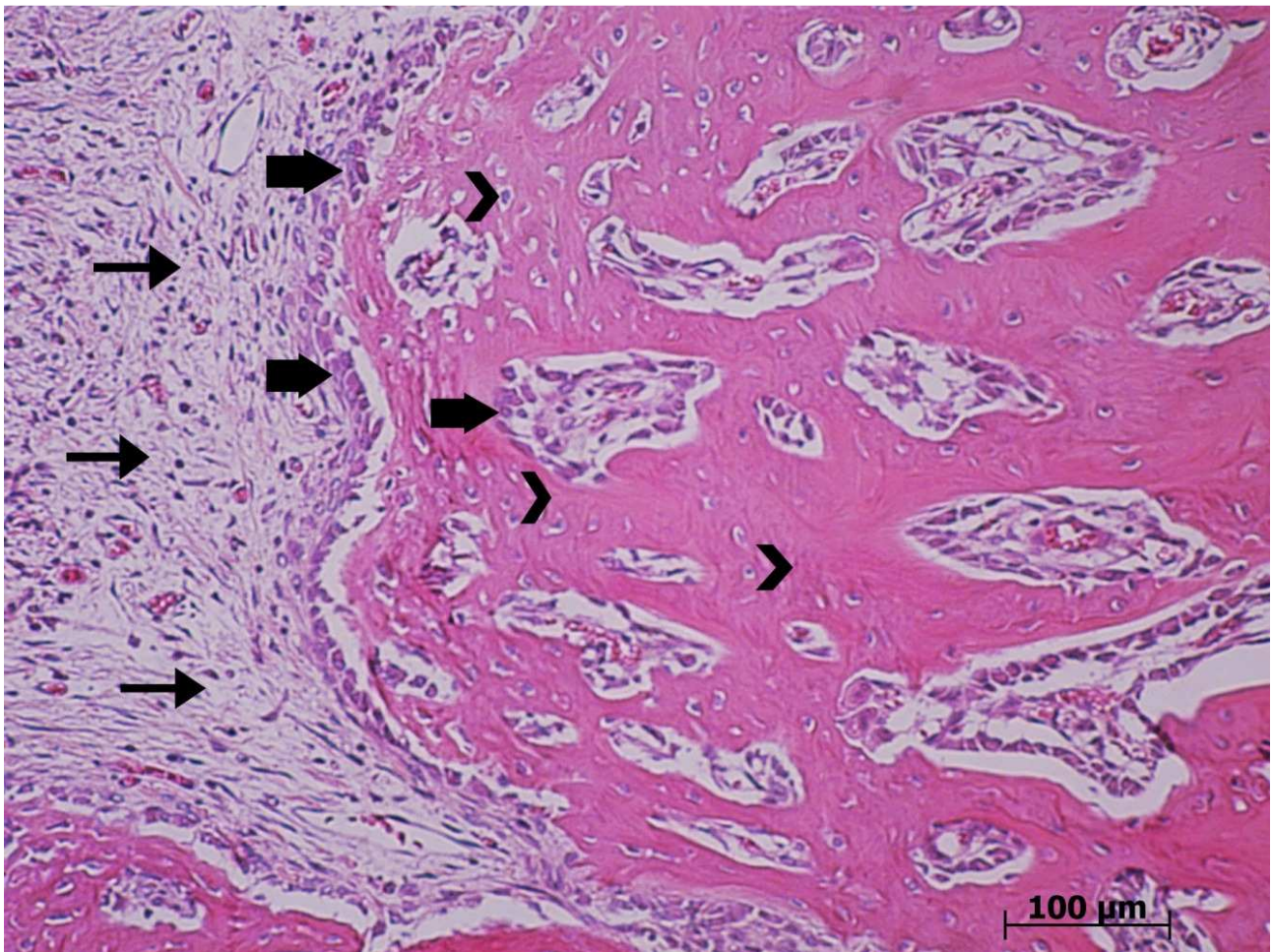


**Abbildung 16:** Gruppe 1 Kontrollseite ohne Therapie: histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Randbereich des *critical size defect*. Neu gebildetes und appositionell aufgelagertes Knochengewebe im Randbereich des *critical size defect* (Pfeilspitze), Bindegewebe (dünne Pfeile), Muskelgewebe (dicke Pfeile); Hämatoxylin-Eosin-Färbung. An den Defekträndern ist nur ein geringer Knochenaufbau zu beobachten.

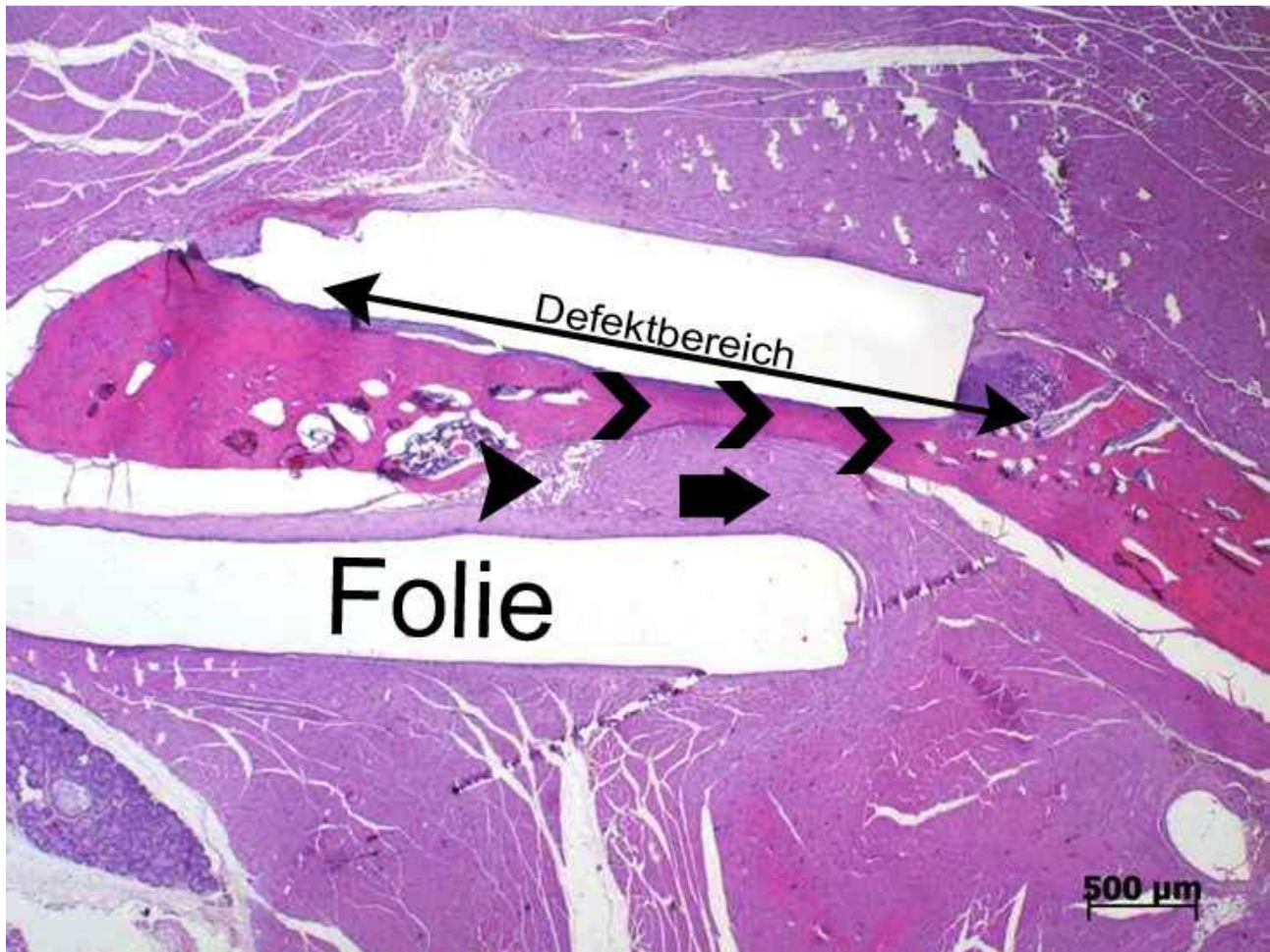


**Abbildung 17:** Gruppe 1 *protected bone healing*, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion. Neu gebildetes Knochengewebe im Defektbereich (große Pfeilspitze), Knochensequester (kleine Pfeilspitze), Bindegewebe (dünne Pfeile), Defektrand (dicker Pfeil); Hämatoxylin-Eosin-Färbung. In den Defektbereichen mit pbh sind diese vor dem umgebenden Weichteilgewebe geschützt. Es findet eine Verknöcherung im Defektbereich ohne komplette knöcherne Durchbauung des *critical size defect* statt. Die Knochenregeneration geht von den Randbereichen des Defektes aus. Es ist Bindegewebe im Defektbereich zu finden



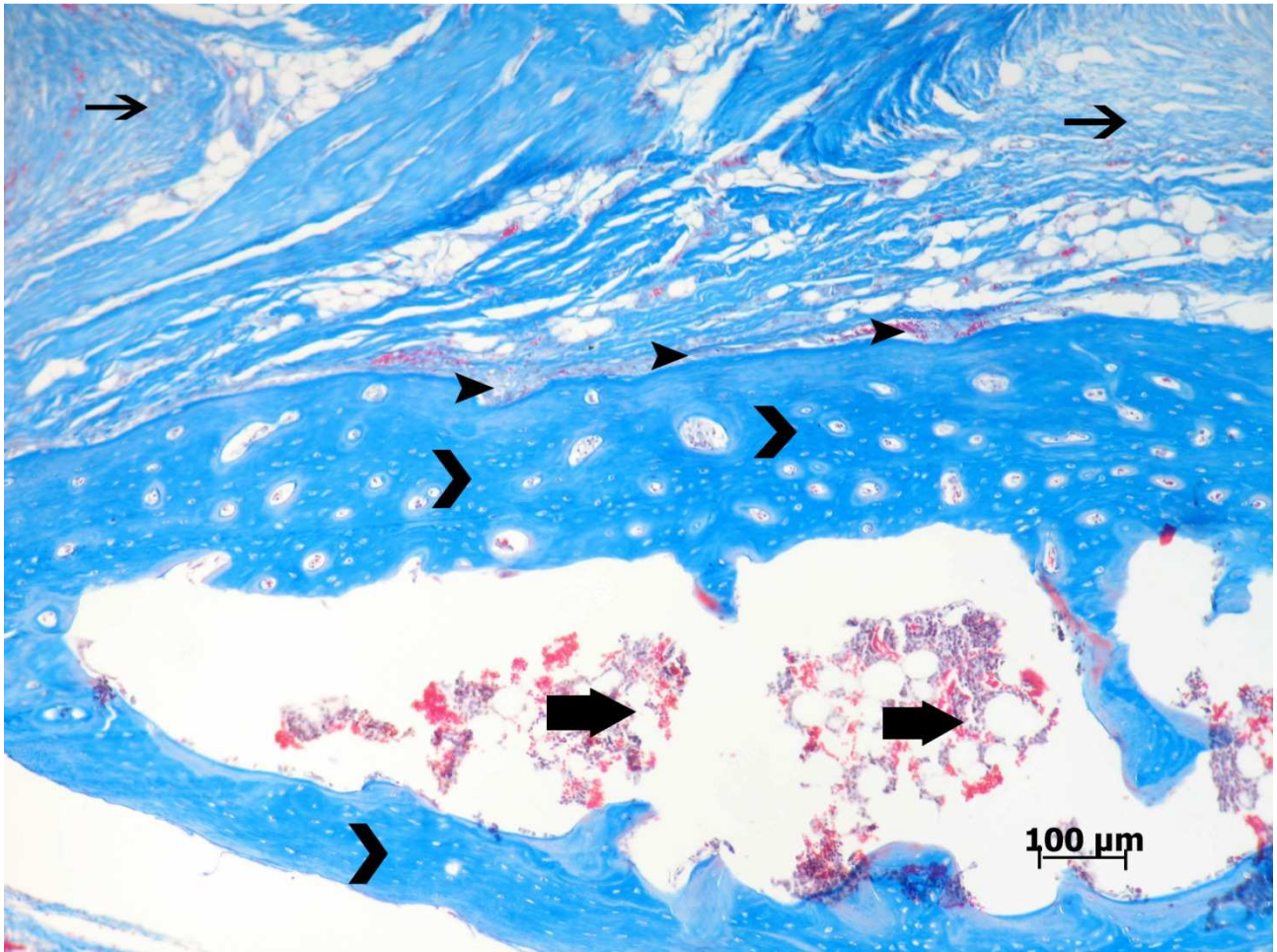


**Abbildung 18:** Gruppe 1 *protected bone healing*, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Randbereich des *critical size defect*, lockeres Bindegewebe (dünne Pfeile), Osteoblasten (dicke Pfeile), Osteozyten (Pfeilspitzen); Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Es findet eine Verknöcherung im Defektbereich ohne komplette knöcherne Durchbauung des *critical size defect* statt. Die Knochenregeneration geht von den Randbereichen des Defektes aus.



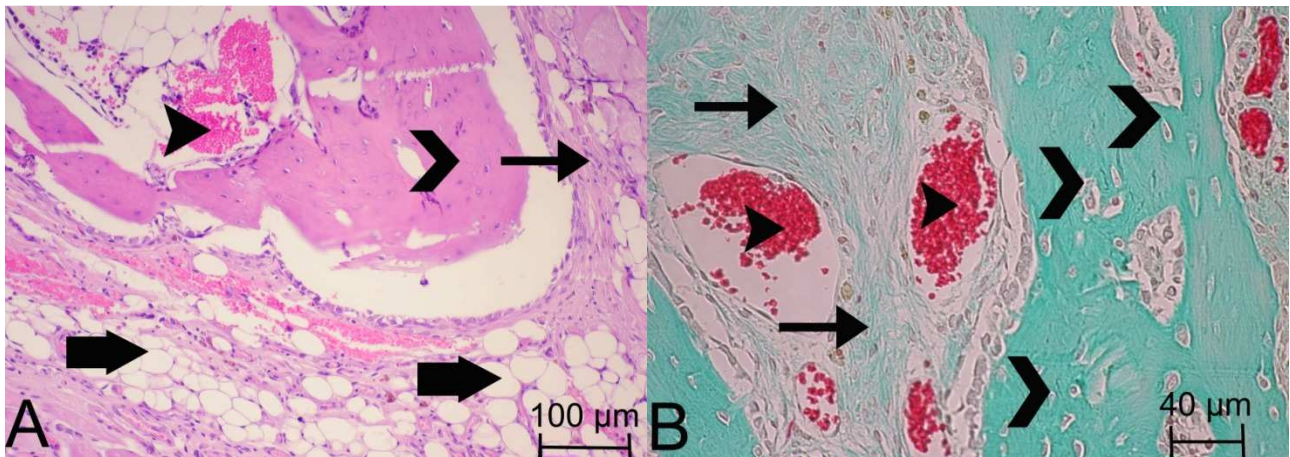
**Abbildung 19:** Gruppe 2 *protected bone healing* mit *adipose derived stem cells* in Fibrinkleber, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, neu gebildetes reifes Knochengewebe im *critical size defect* (dünne Pfeilspitzen), Adipozyten (dicke Pfeilspitze), Muskelgewebe im Defektbereich (Pfeil); Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Unterkieferdefekte zeigen eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich.



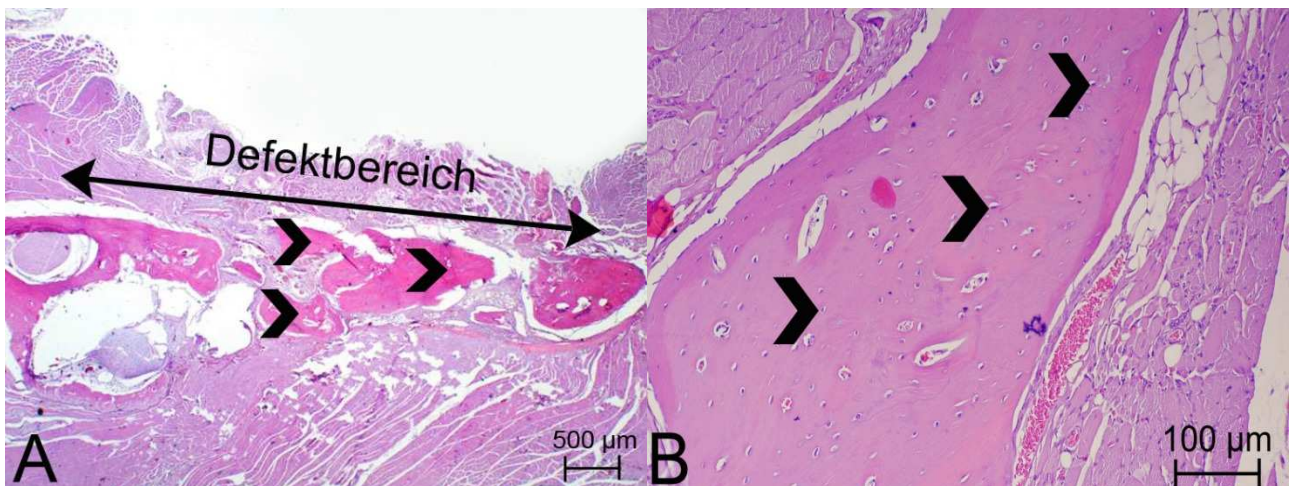


**Abbildung 20:** Gruppe 2 *protected bone healing* mit *adipose derived stem cells* in Fibrinkleber, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, neu gebildetes reifes Knochengewebe (große Pfeilspitzen), Randbereich neu gebildetes Knochengewebe (kleine Pfeilspitzen), Markhöhle (dicke Pfeile), Bindegewebe (dünne Pfeile), Masson-Trichrom-Färbung. Die Unterkieferdefekte zeigen eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich, was in der Masson-Trichrom-Färbung durch das tief blau gefärbte reife Knochengewebe mit vielen vitalen Osteozyten zu erkennen ist (große Pfeilspitzen).



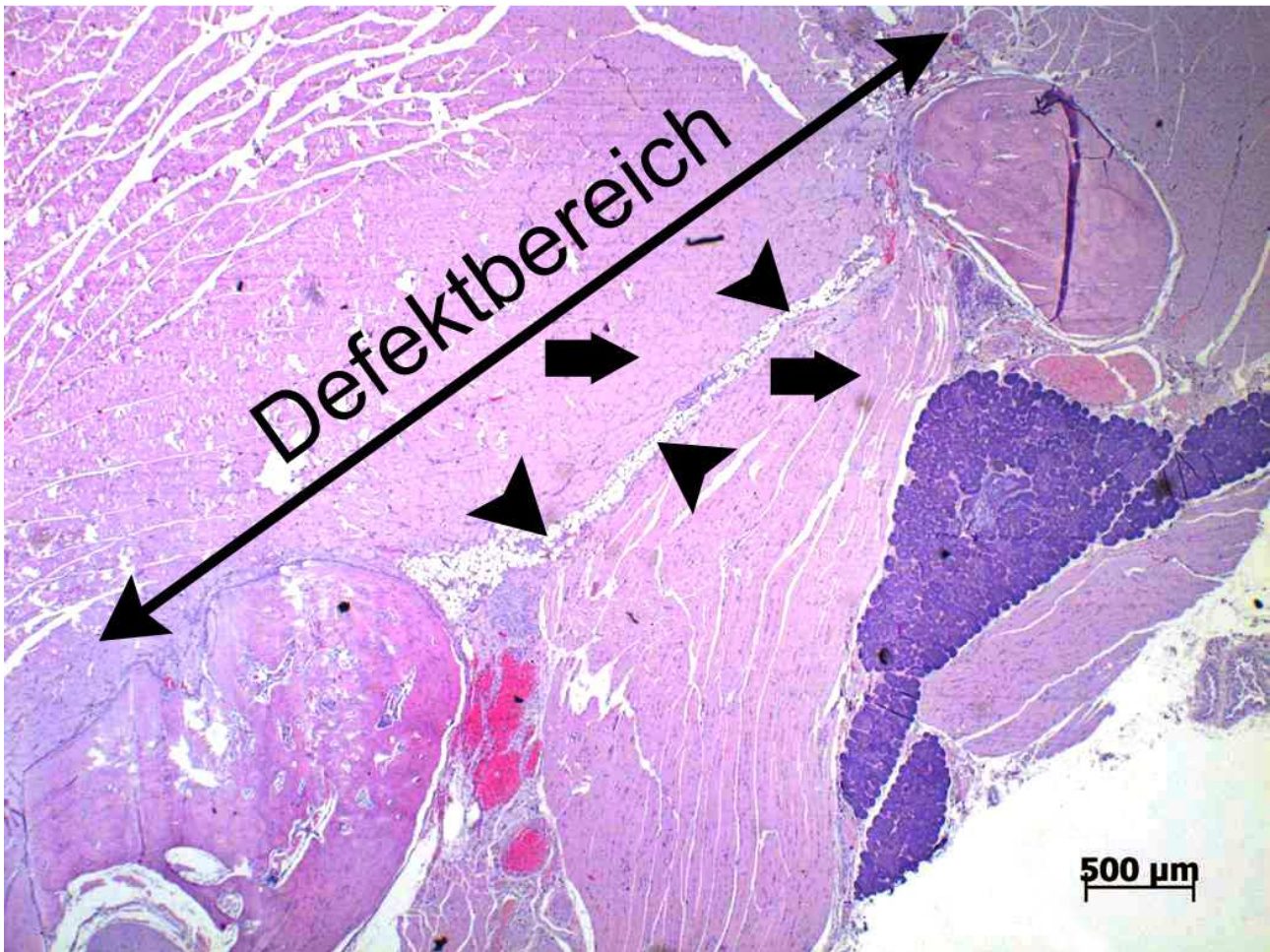


**Abbildung 21:** Bild A: Gruppe 2 *protected bone healing* mit *adipose derived stem cells* in Fibrinkleber, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Adipozyten (dicke Pfeile), Bindegewebe (dünner Pfeil), Gefäße (kleine Pfeilspitze), in der Defektmittle ist eine isolierte Knochenneubildung zu erkennen (große Pfeilspitze), Hämatoxylin-Eosin- Färbung. Bild B: Gruppe 2 *protected bone healing* mit *adipose derived stem cells* in Fibrinkleber, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Gefäße (kleine Pfeilspitzen), Bindegewebe (Pfeile), in der Defektmittle ist eine isolierte Knochenneubildung zu erkennen (große Pfeilspitze), hier fällt eine zellreiche Umgebung der Ossifikationsinseln auf, Goldner-Färbung.

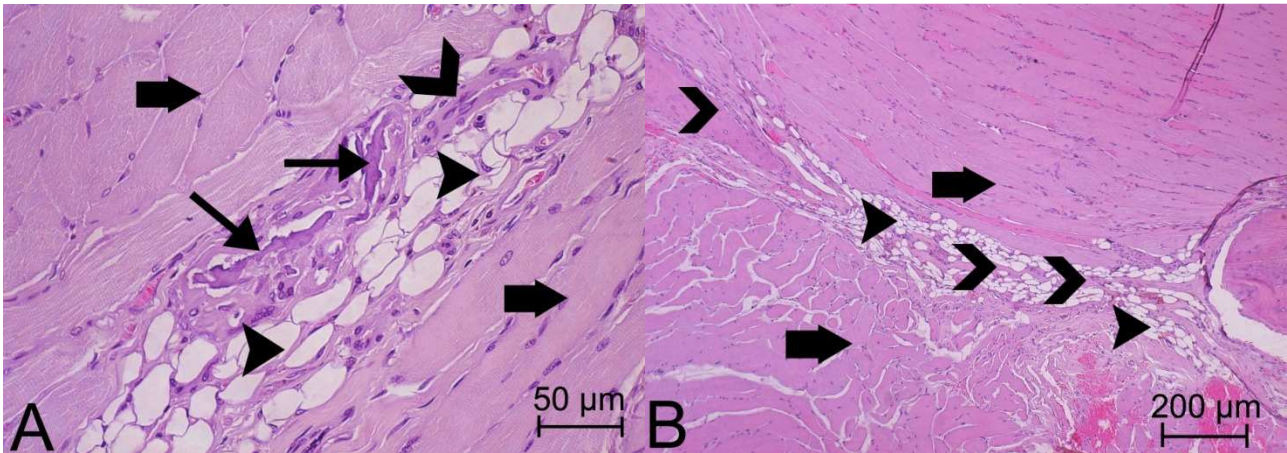


**Abbildung 22:** Gruppe 3 autologes Knochentransplantat, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Bild A: Knochentransplantate (Pfeilspitzen), Bild B: vitales Transplantatfragment mit Osteozytenzellkernen (Pfeilspitzen); Die autologen Knochentransplantate füllen den Defektbereich aus. Diese Knochenfragmente gehen keine knöchernen Verbindungen ein, Hämatoxylin-Eosin-Färbung.



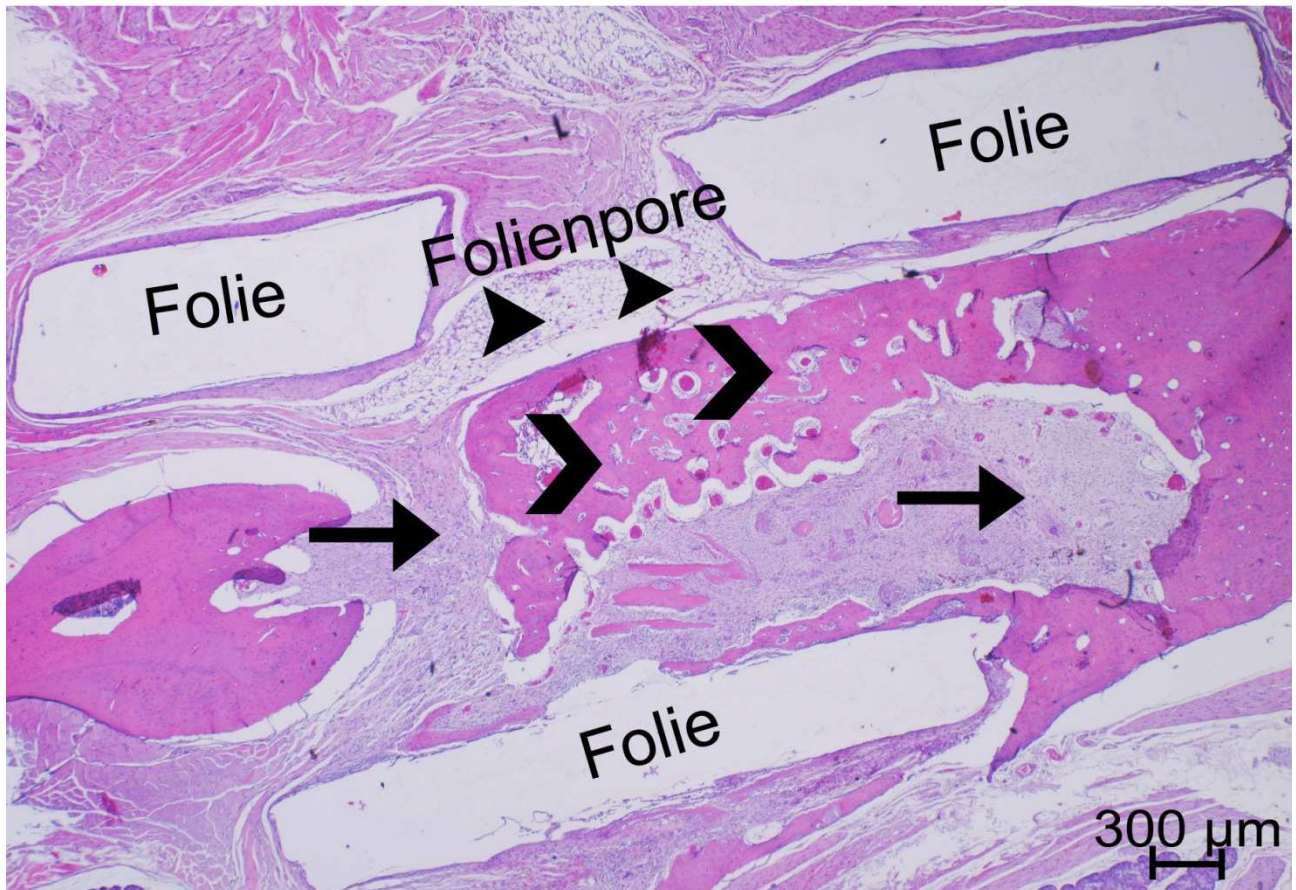


**Abbildung 23:** Gruppe 4 Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Adipozytensaum (Pfeilspitzen) im Defektbereich von Defektrand zu Defektrand zu erkennen; keine Knochenneubildung im Defektbereich zu erkennen, Muskelgewebe ist in den Defektbereich vorgefallen und füllt diesen aus (dicke Pfeile), Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

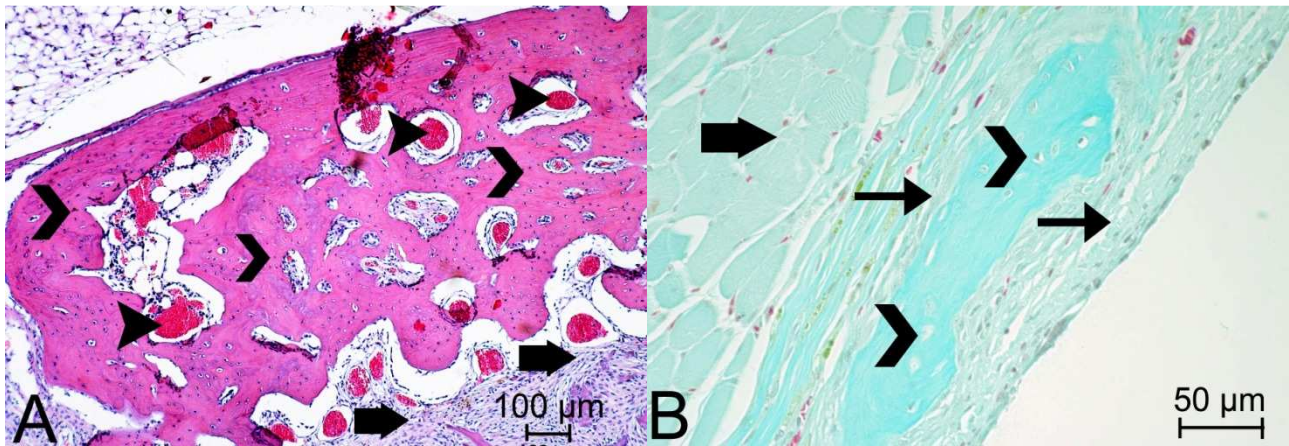


**Abbildung 24:** Bild A: Gruppe 4 Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Muskelgewebe (dicke Pfeile), es sind vermehrt Adipozyten im Defektbereich zu finden (kleine Pfeilspitzen), eine Platzhalterfunktion des Kollagenmaterials während der Knochenregeneration ist nicht eingetreten, es sind lediglich Kollagenscaffoldrückstände (dünne Pfeile) zu erkennen, in diesen Bereichen traten auch Langhans'sche Riesenzellen (große Pfeilspitze) auf, Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Bild B: Gruppe 4 Kollagenscaffold mit *adiposed derived stem cells*, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Muskelgewebe in Defektbereich vorgefallen (dicke Pfeile), neu gebildetes Knochengewebe am Randbereich wie auch isoliert in der Defektmitte (dünne Pfeilspitzen) zu erkennen, Adipozyten (dicke Pfeilspitzen) vermehrt im Defektbereich zu erkennen; Hämatoxylin-Eosin-Färbung.



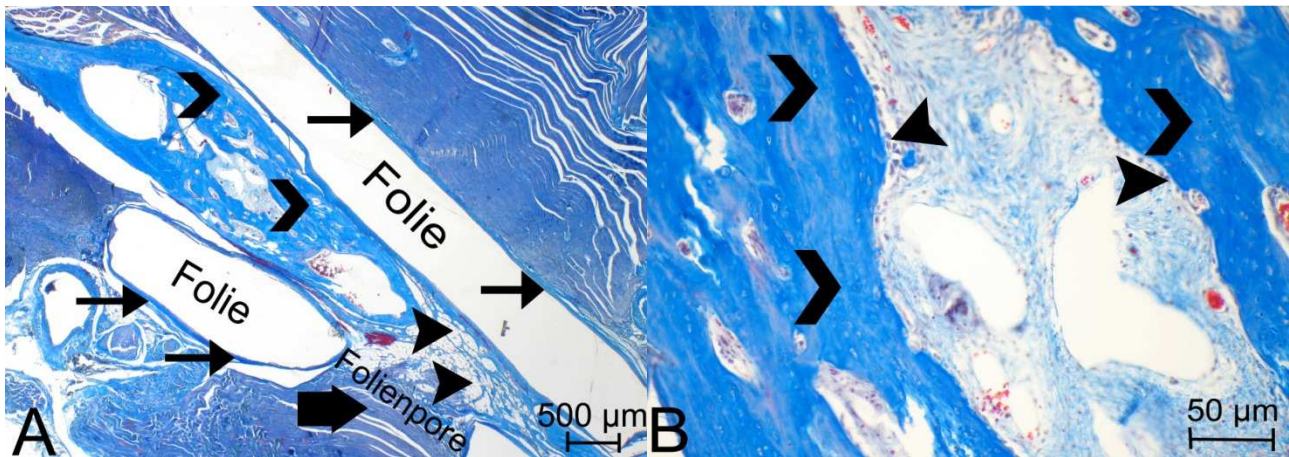


**Abbildung 25:** Gruppe 5 *protected bone healing* mit *adiposed derived stem cells* in Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Bindegewebe im Defektbereich (Pfeile), Fettgewebe (kleine Pfeilspitzen), Defektregionen mit Knochenmaterial komplett durchbaut (große Pfeilspitzen), was durch desmale Ossifikation gekennzeichnet ist, Hämatoxylin-Eosin Färbung.



**Abbildung 26:** Bild A: Gruppe 5 *protected bone healing* mit *adiposed derived stem cells* in Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, isolierte Knochenneubildung in Defektmittle (dünne Pfeilspitzen) mit Markräume (dicke Pfeilspitzen) zu erkennen, Bindegewebe (Pfeile); Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Bild B: Gruppe 5 *protected bone healing* mit *adiposed derived stem cells* in Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, es ist eine isolierte Knochenrekonstruktion in der Defektmittle zu erkennen (Pfeilspitzen), Bindegewebe (dünne Pfeile) und Muskelgewebe sind ebenfalls im Defektbereich zu erkennen (dicker Pfeil), Goldner-Färbung.





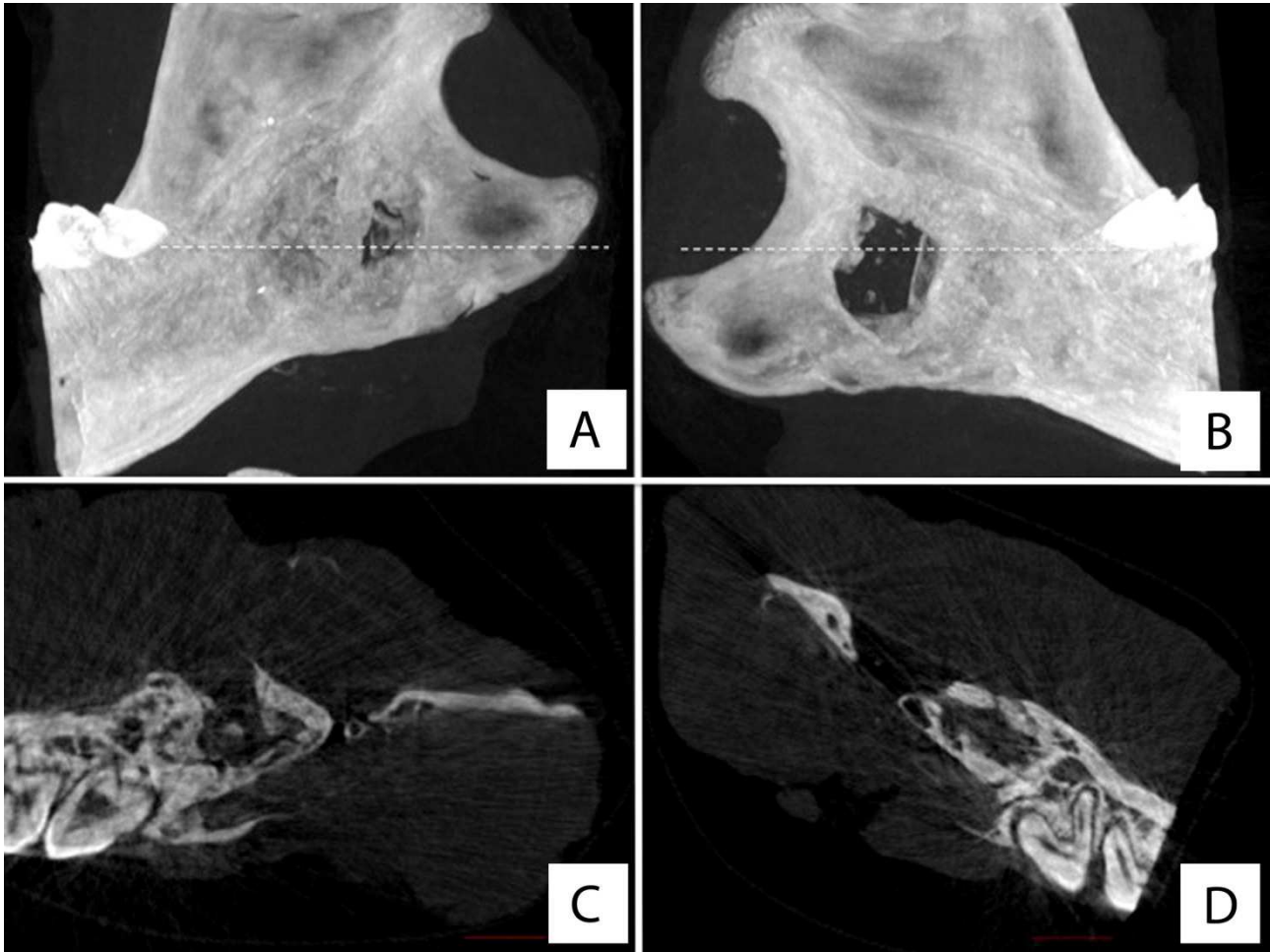
**Abbildung 27:** Gruppe 5 *protected bone healing* mit *adiposed derived stem cells* in Kollagenscaffold, histologischer Schnitt des Unterkieferwinkels in Coronarebene im mittleren Bereich der Defektregion, Bild A: Es ist neu gebildetes reifes Knochengewebe mit Osteozyten, welches den Defektbereich nahezu ausfüllt, zu erkennen (dünne Pfeilspitzen), Fettgewebe (dicke Pfeilspitzen), das Muskelgewebe (dicker Pfeil) wird durch die Folie vom Defektbereich fern gehalten, Es bildet sich eine Bindegewebskapsel um die Folie (dünne Pfeile), Bild B: neu gebildetes reifes Knochengewebe (dünne Pfeilspitzen) isoliert in Defektmitte mit Osteoblasten (dicke Pfeilspitzen); Masson-Trichrom-Färbung.

### 4.4. Mikro-Computertomographie

Mit Hilfe der Mikro-Computertomographie werden zwei- und dreidimensionale Rekonstruktionen des Knochens und der Defektzone angefertigt. Gebiete mit schwachem Trabekelbau sowie verzögerter Osteogenese sind somit gut beurteilbar. Daher wurde zusätzlich zur histologischen Untersuchung der Defektbereiche im Unterkiefer eine Mikro-Computertomographische Messung *ex vivo* durchgeführt, um den neu gebildeten Knochen in den ADSC Transplantatgruppen qualitativ beurteilen zu können und die histologischen Ergebnisse zu bestätigen. Aufgrund der hohen Auslastung des Gerätes konnte nur jeweils eine repräsentative Probe aus den Versuchsgruppen 2, 4 und 5 untersucht werden, diese Proben wurden subjektiv beurteilt. Alle Untersuchungsseiten (Kontrolle und ADSC-Transplantatseite) weisen eine konzentrische Reossifikation mit Schwerpunkt auf dem mesialen Defektbereich auf. Abgesehen von einem kleinen verbleibenden Defekt mit einem Durchmesser von 1 mm ist der *critical size defect* der ADSC behandelten Seite in Versuchsgruppe 2 nahezu vollständig konsolidiert. Zur Bekräftigung der histologischen Ergebnisse zeigt sich in diesem verbleibenden zentralen Defektbereich der ADSC Transplantatseite ein

#### 4. Ergebnisse

verknöchertem Bereich ohne Kontakt zum umgebenden Knochengewebe (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Mikro-Computertomographische Aufnahmen einer repräsentativen Probe aus Versuchsgruppe 1 mit *protected bone healing* mit *adipose derived stem cells* (ADSC) eingebettet in Fibrinkleber (A, C) und Kontrolleseite (B, D). 3D- *maximum-intensity-projection* (MIP) (A, B) und Querschnittsbilder (C, D). Die Architektur des neu gebildeten Knochens ist vergleichbar zur Mikrostruktur in den peripheren knöchernen Regionen ausserhalb des *critical size defect*. Die MIP Darstellung zeigt eine quantitative Differenz von neu gebildetem Knochen innerhalb der *critical size* Defekte mit einer überlegenen Reossifikation auf der Therapie-Seite mit *protected bone healing* mit ADSC eingebettet in Fibrinkleber. Darüber hinaus zeigen die Aufnahmen auf dieser Seite einen isolierten verknöcherten Bereich innerhalb des *critical size* Defektes ohne Anschluss an das umgebende neu gebildete Knochengewebe (A, C).

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion der Methoden

#### 5.1.1. Besiedlung und Art der Trägermaterialien

In einem vorangegangenen Heilversuch führte unsere Arbeitsgruppe die Rekonstruktion von Schädelkalottendefekten bei einem 7-Jährigen Kind mittels autologer Beckenkammspongiosa, einer resorbierbaren makroporösen Membran und autologen ADSC eingebettet in autologem Fibrinkleber durch. Der Heilverlauf zeigte sich komplikationslos (Lendeckel et al. 2004). Auf Grundlage dieser Ergebnisse entwickelte man eine Studie zur Kontrolle und Bestätigung der vorangegangenen Ergebnisse.

Man entschied sich als Trägermaterial für Fibrinkleber zur Einbettung der ADSC. Fibrinkleber sind nicht zytotoxisch und vollständig resorbierbar und werden vom Organismus gut toleriert. Es sind nur wenige Fälle von Nebenwirkungen bekannt (Alving et al. 1995). Der Fibrinkleber bleibt in situ, während die Zellen sich vermehren und ins neue Gewebe differenzieren, bevor das Trägermaterial völlig resorbiert ist. Zusätzlich fördert der Fibrinkleber die Angiogenese über chemotaktische und mitogene Stimuli, was wiederum die Zellwanderung, Proliferation und Matrixsynthese fördert (Lee et al. 2005). Fibrinkleber wird mit Erfolg in Studien (Lee et al. 2005; Ito et al. 2006; Lee et al. 2008) als Trägermaterial für Zellen verwendet. Auch Singh et al. (2011) kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass Fibrinkleber als Trägermaterial für zellbasierende Verfahren geeignet ist. In den *critical size defect* der immuninkompetenten Ratte zeigen die ausschließlich mit Fibrinkleber gefüllten Defekte keine größere Heilung im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne Therapie des Defektes. Daher war es wichtig die Ergebnisse des vorherigen Heilversuchs zu überprüfen und zu bestätigen. Da eine vorherige Kultivierung der Zellen mit diesem Material nicht durchführbar ist und um den Zellen schon in vitro ein dreidimensionales Gerüst zur Ausbreitung und Vernetzung zur Verfügung zu stellen, wird sich in der vorliegenden Arbeit für ein weiteres *scaffold*-Material entschieden. Aufgrund der Auswertungsmethodik auf Grundlage der fpvCT Aufnahmen und der Grauwertstufenanalyse wird sich für ein möglichst wenig röntgendichtes Material entschieden. Die Grauwertstufen des Kollagenscaffolds sind erheblich niedriger im Vergleich zu Knochenmaterial, wodurch man Knochengewebe von Trägermaterial unterscheiden kann. Die gängigen Trägermaterialien wie Kalzium-Phosphatkeramiken, z.B. Tricalciumphosphat und Hydroxylapatit, erfüllen viele Kriterien eines „idealen Knochenersatzstoffes“. Sie können aufgrund ihrer hohen



Dichte und der daraus resultierenden hohen Grauwertstufen im Bereich des Knochens in dieser Studie aber nicht verwendet werden. Aufgrund seiner vielversprechenden Eigenschaften wie der günstigen Porenstruktur, seiner Biokompatibilität, sowie seiner Resorbierbarkeit ist Kollagen als Knochenersatzstoff und Trägermaterial geeignet (Cornell 1999). Es besteht eine progressiv stimulatorische Wirkung auf ADSC hinsichtlich der Osteogenese in vitro, wenn sie in einem dreidimensionalen Kollagengerüst kultiviert werden, im Vergleich zu einer Kultivierung in einfachen Kulturflaschen (Gabbay et al. 2006). Kollagen trägt zur Mineralablagerung und Vaskularisierung bei. Zusätzlich bindet es Wachstumsfaktoren. Damit entsteht ein günstiges Umfeld zur Knochenregeneration (Cornell 1999). Das *scaffold* lässt sich sehr gut mit ADSC besiedeln. Das Kulturmedium durchdringt die Matrix. Durch regelmäßige Kontrollen unter dem inversen Mikroskop, kann eine Ausbreitung der Zellen außerhalb des *scaffold* ausgeschlossen werden. Studien zeigen, dass nach einer gemeinsamen Kultivierungszeit von 14 Tagen, mesenchymale Stammzellen zu großen Teilen in Kollagenscaffolds oder deren Komposite eingewandert bzw. eingewachsen sind. Nach 7 Tagen ist nur eine oberflächliche Besiedlung des *scaffold*-Materials zu beobachten (Niemeyer et al. 2003; Yoon et al. 2007; Kakudo et al. 2008; Xu et al. 2009).

Das *tissue engineering* von Knochengewebe ist ein Forschungsfeld mit bereits in die Klinik übertragenen Anwendungen, das mit einiger Wahrscheinlichkeit die bisherige klinische Arbeitsweise in der rekonstruktiven Chirurgie nachhaltig verändern wird. Aber auch bei guten Ergebnissen mit diesem neuen Verfahren sind toxikologische und mikrobiologische Untersuchungen für reproduzierbare, konsistente und verlässliche Behandlungsergebnisse unverzichtbar. Mögliche unerwünschte immunologische Langzeitreaktionen müssen ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Obwohl bisher in der Kenntnis der Knochenbiologie schon große Fortschritte erreicht wurden, sind noch weitere Studien zum Verständnis dessen notwendig, was genau für die Entwicklung eines künstlich gezüchteten Knochens benötigt wird. Aspekte wie die Interaktion von Wachstumsfaktoren und Zellen müssen näher untersucht werden. Und trotz bedeutender Fortschritte auf dem Gebiet der Materialwissenschaften sind spezifische zelluläre Antworten auf molekularer Ebene noch nicht entschlüsselt. Des Weiteren müssen auch die Verarbeitungstechniken für die eingesetzten Gerüste verbessert werden, um die Ergebnisse bisheriger Methoden zu übertreffen (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Die Vaskularisierung von gezüchtetem Knochengewebe in vitro ist bislang, trotz vielfältiger Therapieansätze, ein noch nicht gelöstes Problem (Wenger et al. 2004). In vivo kann die Angiogenese jedoch durch den Einsatz von

entsprechenden Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF positiv beeinflusst werden (Ahrendt et al. 1998). Weiterhin kann in vitro eine frühzeitige Mineralisation an der Oberfläche des Zell-Matrix-Konstrukts beobachtet werden, was die Ernährung und die Sauerstoffversorgung für die tiefer gelegenen Zellen zusätzlich verschlechtert (Martin et al. 1998).

### 5.1.2. Tiermodell

Die athymische Nacktratte wird als Versuchstier ausgewählt, da ihre bestehende Immundefizienz eine Applikation humaner fettabgeleiteter Stammzellen ohne Abstoßungsreaktion ermöglicht. Ratten sind ein allgemein anerkanntes Modell zur Veranschaulichung tierischer und menschlicher Knochenheilungsprozesse (Erben 1996). Im Jahr 1953 tritt eine haarlose Mutation in einer Auszucht-Kolonie von Rowett Hooded Ratten am Rowett Research Institute in Schottland auf. Zu dieser Zeit existierten noch unzureichende Informationen über die Funktion des Thymus innerhalb der Immunabwehr. Da die Immundefizienz der Nacktratten damals nicht erkannt wird, nimmt man auch keine Isolierung dieser Mutation vor. Eine Kolonie dieser Ratten wird noch bis 1960 weitergezüchtet. Das rezessive Gen, welches verantwortlich für diesen Phänotyp war, geht jedoch nicht verloren und besteht auf einer niedrigen Genfrequenz in dieser Kolonie von Ratten weiter bis 1975 weitere homozygote Mutanten auftauchen. Diese autosomal rezessive Mutation wurde als *rnu* (*Rowett nude*) bezeichnet (Festing et al. 1978). Die *rnu*-Ratten können vorübergehend schwachen Haarwuchs zeigen. Immunologisch wird die Nacktmuation begleitet von einer Aplasie des Thymus, welcher nur in einer rudimentären Form ohne Lymphozytenpopulationen existiert. Mit zunehmendem Alter akkumulieren *rnu*-Ratten Zellen mit T-Zell-Markern, allerdings sind sie unfähig reife T-Zellen zu bilden und haben dadurch schwere Defekte in der T-Zell vermittelten Immunantwort (Festing et al. 1978; Fossum et al. 1980; Vos et al. 1980). Es fallen erhöhte Werte der neutrophilen Granulozyten auf. Auch in sekundären lymphoiden Organen treten lymphozytäre Defizienzen auf (Berridge et al. 1979; Brooks et al. 1980; Fossum et al. 1980; Vos et al. 1980; Douglas-Jones et al. 1981; Vos et al. 1983; Hougen et al. 1987; Klausen und Hougen 1987). Die *rnu*-Ratte hat ein circa 20% geringeres Körpergewicht im Vergleich zum durchschnittlichen Gewicht von heterozygoten Tieren (Schuurman et al. 1992). Man kann Nacktratten unter konventionellen Bedingungen halten, jedoch haben diese athymischen Tiere unter diesen Haltungsbedingungen nur eine Lebenserwartung von circa 9 Monaten und viele überleben nicht länger als vier Monate (Hedrich 1990). Idealerweise werden *rnu*-Ratten unter spezifisch pathogen freien (SPF) Haltungsbedingungen untergebracht. Hier sind die Tiere vor opportunistischen Infektionen geschützt, Kümmerer treten seltener auf und die *rnu*-Ratte kann ein Alter von bis zu

zwei Jahren erreichen (Vaessen et al. 1986; Hedrich 1990). Durch in-vivo-Versuche mit rnu-Ratten kann gezeigt werden, dass sowohl die Reaktion auf thymusabhängige Antigene, die Abstoßung von allogenen Transplantaten als auch die „graft-versus-host“ Reaktion ausbleibt. Die B-Lymphozyten können ohne eine T-Zell Unterstützung nicht effizient arbeiten (Schoorman et al. 1992). Es ist jedoch eine erhöhte Aktivität von Makrophagen und Killerzellen bei athymischen Ratten beobachtet worden, was auf eine Kompensation der defizienten T-Zell Abwehr zurückzuführen ist (Tønnesen und Rolstad 1983; Rolstad und Fossum 1987). Grinnemo et al. (2004) zeigen, dass rnu-Ratten im Gegensatz zu immunkompetenten Ratten keine xenogenen Transplantate abstoßen. Somit dient die Nacktratte als geeignetes Tiermodell für die biologische Forschung. Sie hat jedoch den Nachteil der hohen Anfälligkeit gegenüber Infektionen, sowie hohe Anschaffungs- und Haltungskosten (Hedrich 1990). Es sollte daher überlegt werden, ob man in Folgestudien auf eine allogene Transplantation, innerhalb eines weniger pflegeintensiven und daher auch kostengünstigeren Rattenmodells umsteigen könnte.

### 5.1.3. Operationsmodell und Gruppeneinteilung

Die Anforderungen an ein Operationsmodell zur Überprüfung der Knochenregeneration sind hoch. Im Tiermodell ist ein Defekt von kritischer Größe so definiert, dass die intraossäre Wunde nicht durch Knochenformation während der Lebenszeit des Tiers ausheilt. Er sollte dabei stabil sein und keine Mobilität erlauben, so dass keine Frakturen entstehen können. Das verwendete Defektmodell ist bei Ratten gut untersucht. Die Lagerqualitäten sowie die „kritische Größe“ sind für die Trepanationsdefekte im Kieferwinkelbereich, der Schädelkalotte und für den Kontinuitätsdefekt am Femur hinlänglich bekannt (Schmitz und Hollinger 1986; Hollinger und Kleinschmidt 1990; Bosch et al. 1998). Die biomechanischen Biegekräfte und Druckkräfte, welche durch die Muskulatur während des Kauens auf den Kieferwinkelbereich einwirken, dienen als zusätzlicher Wachstumsstimulus und führen zu einer besseren funktionellen Beurteilbarkeit der Knochenregeneration (Schmidt-Rohlfing et al. 2009). Diese Effekte würden bei einem Defektmodell an der Schädelkalotte unberücksichtigt bleiben. Die Schädelkalotte ist auch aufgrund ihrer geringeren Vaskularisierung im Gegensatz zum Unterkiefer als ersatzschwach anzusehen (Lexer 1908). Die Instabilität und die dadurch nötige externe bzw. interne Fixierung der Defektbereiche an langen Röhrenknochen gehen mit einem erhöhten Infektionsrisiko der Operationsbereiche einher (Horner et al. 2010). Oftmals reicht hier eine Osteosynthese bei voller Belastung der Gliedmaßen nicht aus, um die Entstehung einer hypertrophen Pseudarthrose zu verhindern. Aufgrund der Gefahr des Weichgewebevorfalls in den Defektbereich und die daraus

entstehende Gefahr der Verdrängung des Fibrinklebers bzw. des Kollagenscaffolds mit ADSC-Transplantat, wurde sich zusätzlich zu einer Methode des *protected bone healing* mit einer macroporösen resorbierbaren Membran entschieden. Dies ist eine gängige Methodik um die Knochenregeneration im Defektbereich vor Weichgewebevorfall zu schützen (Holmes et al. 2004). Ob die alleinige Methodik des pbh mittels Membranen die Knochenregeneration positiv beeinflusst, wird äußerst kontrovers beurteilt. Die meisten Ergebnisse dokumentieren jedoch, dass pbh mittels resorbierbaren Membranen zu einer besseren knöchernen Wundheilung der Defekte führt (Dahlin et al. 1988; Stetzer et al. 2000). Um den Einfluss der Methode auf die Knochenheilung zu kontrollieren, war es nötig, eine Gruppe mit ausschließlich pbh einer Kontrollgruppe ohne Therapie gegenüberzustellen. In den folgenden Gruppen konnte man die Unterkieferseiten mit pbh und die Seiten mit pbh und Transplantat vergleichen. Um die Platzhalterfunktion des Kollagenscaffolds zu überprüfen, wird in dieser Arbeit eine Gruppe ohne pbh und ausschließlich *scaffold* eingerichtet. Durch die paarig angelegten Unterkieferseiten liegt eine Anwendung des *split mouth* Versuchsmodells nahe. Mit dem *split mouth* Design wird ein Versuchsmodell beschrieben, bei dem bei jedem Individuum zwei oder mehrere Behandlungen vorgenommen werden, welche jeweils gesonderte Teilabschnitte der Mundhöhle in Anspruch nehmen. Dadurch ermöglicht ein *split mouth* Design den Vergleich verschiedener Therapieformen, wobei die interindividuellen Unterschiede ausgeschlossen werden. Durch vergleichende Studien am selben Patienten kann die Irrtumsvarianz im Gegensatz zu Studien, die verschiedene Versuchsindividuen miteinander vergleichen, reduziert werden. Dies resultiert in einer Erhöhung der statistischen Trennschärfe und führt damit zu einer geringeren Anzahl an benötigten Versuchstieren (Hujoel und DeRouen 1992). Das *split mouth* Design ist daher die Untersuchungsmethode der Wahl, um verschiedene Behandlungsmethoden miteinander zu vergleichen (Hujoel und Loesche 1990). Obwohl die Tiere ausreichend analgetisch versorgt wurden, zeigen einige der hier so therapierten Tiere erhebliche Gewichtsverluste und Symptome einer leichten Exsikkose während der ersten postoperativen Tage. Dies ist zum größten Teil auf die Lage des *critical size defect* und die Manipulationen während der OP am Unterkieferwinkel und die damit verbundene verringerte Futter- und Wasseraufnahme zurückzuführen.

### 5.1.4. Radiologische Methoden

Im Bereich des *tissue engineering* von Knochen ist die Projektionsradiographie eine weit verbreitete Untersuchungsmethode zur Verlaufskontrolle (Saadeh et al. 2001; Fialkov et al. 2003; Vögelin et al. 2005; Oest et al. 2007). Sie ist kostengünstig und je nach Tier- und Operationsmodell benötigt man

nicht immer eine Anästhesie. Mit ihrer Hilfe kann in vivo die Osteosynthese kontrolliert und der Heilungsverlauf dargestellt werden. Diese Methodik hat jedoch eine begrenzte Auflösung. Es wird ein dreidimensionales Geschehen auf zwei Ebenen reduziert, daher kann es zu Fehleinschätzungen des räumlichen Geschehens und damit der Knochenregeneration im Untersuchungsbereich kommen. Der größte Nachteil ist, dass sich die Aufnahmeergebnisse nicht quantifizieren lassen, also das neu gebildete Knochengewebe im Defektbereich sich nur qualitativ beurteilen lässt. Einige Autoren versuchen diesen Nachteil mit der Bildung von eigenen *scores* zu überwinden, um die Ergebnisse zu objektivieren und zu quantifizieren (Hedberg et al. 2005b). Da sowohl die fpvCT Technologie, wie auch die Micro-CT Technologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung stehen und aufgrund der doch erheblichen Nachteile der Projektionsradiographie, wird sich in der vorliegenden Arbeit für eine dreidimensionale Darstellungsmethode entschieden. Objekte im computertomographischen Hochkontrastbereich, zum Beispiel Knochengewebe gegen Weichteilgewebe, sind durch die Methode der fpvCT kontrast- und detailreich darzustellen. In verschiedenen Veröffentlichungen wird gezeigt, dass das fpvCT sehr gut zur Darstellung von Knochendetails geeignet und herkömmlichen Computertomographen überlegen ist (Greschus et al. 2005; Reichardt et al. 2008; Schaaf et al. 2008; Schulte-Geers et al. 2011). Das fpvCT erzielt bei vergleichbarer Strahlendosis und Untersuchungsdauer eine wesentlich bessere Ortsauflösung (isotrope Voxelkantenlänge bis zu 50 µm) als herkömmliche Computertomographen (Obert et al. 2005). Das in dieser Studie verwendete fpvCT ist das Model eXplore Locus Ultra (GE Global Research, Niskayuna, New York, USA). Es handelt sich um ein Vorserienmodell. Im *bone tissue engineering* ist das Micro-CT eine etablierte Methode zur Evaluierung von Knochengewebe (Hedberg et al. 2005; Jones et al. 2007). Es kann durch seine sehr hohe Auflösung selbst kleinste Details darstellen. Im Vergleich zum fpvCT ist die Strahlendosis deutlich höher, die Untersuchungszeit länger und die zu untersuchende Probe darf eine Kantenlänge von 2 cm nicht überschreiten (Jorgensen et al. 1998). Aufgrund der technischen Voraussetzungen ist eine in vivo Untersuchung nicht möglich. Um eine maximale Auflösung zu erreichen, müssen die Proben um den Defekt auf die Größe von 1cm zugeschnitten werden. Aufgrund der starken Artefaktbildung, muss sämtliches Zahnmaterial entfernt werden. Da es sich um Endpunktanalysen handelt, kann keine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Knochenregeneration gemacht werden. Durch die in dieser Studie ermittelten Verlaufskontrollen und den dadurch abzuschätzenden Abschlusszeitpunkt der Knochenregeneration in den Transplantatgruppen, ist für zukünftige Studien eine ex-vivo Endpunktanalyse mittels Micro-CT geplant. Hier kann man ähnlich der in dieser Arbeit

verwendeten Grauwertanalyse der fpvCT Aufnahmen vorgehen um eine Knochenvolumenberechnung des neu gebildeten Knochens im Defektbereich durchzuführen (Park et al. 2011).

War bis vor wenigen Jahren die Bearbeitung eines CT-Datensatzes nur mit teurer kommerziell erhältlicher Hardware und umfangreichen EDV-Kenntnissen möglich (Robb und Hanson 1991), so kann inzwischen auch auf einem leistungsfähigen PC medizinische Bildbearbeitung betrieben werden. Aus den generierten Schnittbildserien lassen sich heutzutage, auch mit frei verfügbaren Softwareprogrammen mit geringem Zeitaufwand, dreidimensionale Rekonstruktionen anfertigen und auswerten. Gängige Softwareprogramme zur dreidimensionalen Darstellung und Auswertung von computertomographischen Aufnahmen, wie z.B. Analyze (Bio Medical Imaging Resource, Rochester Minnesota, USA), können das Dateiformat der rekonstruierten Schnittbilder des fpvCT nicht einlesen. Daher wird auf die Bildbetrachtungssoftware des fpvCT Herstellers GE Global Research zurückgegriffen. Dieses Bildbetrachtungsprogramm Micro View 2.1.2 ist auf die zweidimensionale und dreidimensionale Visualisierung im medizinischen Bereich spezialisierte Software. Die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden quantifizieren den Anteil des regenerierten Gewebes semiquantitativ mit Hilfe eines Scoresystems (Hedberg et al. 2005). Dieses hängt oftmals stark von der Einschätzung des jeweiligen Untersuchers ab. Wenige Studien haben bisher Micro View zur Analyse knöcherner Strukturen von fpvCT Aufnahmen eines *critical size defect* Modells an der Ratte verwendet (Umoh et al. 2009). Die vorliegende Arbeit ist eine der ersten, welche eine neue Auswertungsmethode zur Quantifizierung von Knochenregeneration im *critical size defect* Modell der Ratte, anhand von fpvCT Aufnahmen und einer Grauwertanalyse mit Hilfe dieser frei verfügbaren Software, mit Erfolg durchgeführt hat. Die zur ossifizierten Defektflächenberechnung verwendete frei verfügbare Bildbetrachtungssoftware OsiriX (Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz) ist in vorherigen Studien zur Darstellung von CT-Aufnahmen und der damit verbundenen Analyse von Knochendefekten im *critical size defect* Modell der Ratte verwendet worden (Lei et al. 2009). Diese Software bietet einen vollständigen Satz von Funktionen zur Analyse von DICOM Datensätzen (Rosset et al. 2004).

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1. Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Gewinnung von ADSC ist der Isolationsprozess der Stammzellen aus der heterogenen Zellpopulation nach der enzymatischen Verdauung der schwierigste Teil. Durch die Verdauung

werden neben den Stammzellen auch mikrovaskuläre Endothel- und glatte Muskelzellen aus dem Fettgewebsverband gelöst (Strem et al. 2005). Durch die Zentrifugation lassen sich anhand des Dichtegradienten in einem ersten Schritt Stammzellen und Hämatozyten von den restlichen Zellen, vor allem Adipozyten mit ihrem hohen Lipidanteil, trennen (Martínez-Estrada et al. 2005). Durch die zahlreichen Waschprozesse sollte der Anteil von Hämatozyten möglichst gering gehalten werden. Die weitere Isolierung der Stammzellen erfolgt mit Hilfe der adhärenen Eigenschaften der Stammzellen auf Kunststoffoberflächen der Zellkulturgefäße (Ashjian et al. 2003). Nach dem ersten Kulturmediumwechsel werden so mit dem Medium alle nicht adhärenen Zellen entfernt. Zur Kontrolle dieser ersten Schritte wird die Morphologie der Zellen mit denen aus der Literatur verglichen (Ashjian et al. 2003; Martínez-Estrada et al. 2005; Wagner et al. 2005). Der Ausschuss für Stammzellforschung der Internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapien hat für die Identifizierung von humanen mesenchymalen Stammzellen vier Kriterien vorgeschlagen. Nach der Auffassung dieser Kommission müssen mesenchymale Stammzellen unter standardisierten Kulturbedingungen kunststoffadhärent wachsen, sie müssen die Fähigkeit zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung besitzen, sie müssen die Marker CD73, CD90, CD105 exprimieren und sie dürfen keine Expression von Markern der hämatopoetischen Zelllinie (CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 $\alpha$ ) zeigen (Dominici et al. 2006). Die wesentlichen Stammzellmerkmale der ADSC sind die Fähigkeit der Adhäsion auf Kunststoff, die Bildung fibroblastenähnlicher Kolonien, eine umfangreiche proliferative Kapazität und die Expression mehrerer bestimmter Zell-Oberflächen-Antigene. Sie sollten ebenfalls die Fähigkeit besitzen, sich in mehrere Zelllinien zu differenzieren, einschließlich der Knochen-, Muskeln-, Knorpel- und Epithelzelllinie, sowie in neurale Vorläuferzellen (Gronthos et al. 2001). Die exakte Charakterisierung erfolgt mit Hilfe durchflusszytometrischer Analysen. Dabei dient die in der Literatur beschriebenen Oberflächenmarker für adipogene Stammzellen als Orientierung (Gronthos et al. 2001; Zuk et al. 2002; Strem et al. 2005). In dieser Arbeit werden die sechs Marker CD13, CD49d, CD105, CD117, CD166 und Stro-1 ausgewählt und deren Expression an den isolierten Stammzellen überprüft. Alle Zellen der Kultur exprimieren die Marker CD105, CD166 und CD117, was die Homogenität der Stammzellkultur bestätigt. Die drei Marker Stro-1, CD49d und CD 13 lassen sich in Passage 3 bei einer geringeren Zellzahl nachweisen. Ihr positiver Anteil steigt zur Passage 10 hin stark an. Das Stromal-Antigen-1 (STRO-1) wird bewusst ausgewählt, da seine Expression sehr spezifisch für mesenchymale Stammzellen ist. Bei einigen Arbeiten wird das Antigen als der mesenchymale Stammzellmarker angesehen (Gronthos et al. 1994; Dennis et al.

2002; Zuk et al. 2002; De Ugarte et al. 2003). In anderen Arbeiten wird seine Bedeutung relativiert, da er bei den fettabgeleiteten Stammzellen nicht nachgewiesen werden konnte (Gronthos et al. 2001). Ursachen der verschiedenen Nachweise können, in Analogie zu Gimble und Guilak (2003), durch verschieden angewandte Techniken der Nachweismethoden, der verwendeten monoklonalen Antikörper gegen verschiedene Epitope oder unterschiedlicher Primer im Rahmen der PCR begründet sein. Andere Forschungsgruppen dokumentieren bei den CD-Markern CD49d und CD117, in frühen Passagen der Zellexpansion einen ähnlich niedrigen prozentualen Anteil der markerpositiven Zellen. Gronthos et al. (2001) beschreiben bei ihren durchflusszytometrischen Untersuchungen der ADSC einen Wert von  $9 \pm 2 \%$  CD49d+ Zellen und Lee et al. (2004) sprechen schon bei einem Wert von 2,3 % CD117+ Zellen von einer positiven ADSC-Zellkultur für diesen Marker. Zusammenfassend kann man sagen, dass die wesentlichen Charakteristika von Stammzellen durch die Zellkultur dieser Studie erfüllt werden und darauf schließen lassen, dass es sich um eine Kultur von fettabgeleiteten Stammzellen handelt. ADSC sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Diese Zytokine und Wachstumsfaktoren können auf die kultivierten Zellen wirken und zur Zelldifferenzierung in höheren Passagen führen. In der Literatur ist eine solche spontane Ausdifferenzierung der fettabgeleiteten Stammzellen in höheren Passagen beschrieben (Planat-Benard 2004; Steffen 2009). Man würde bei den durchflusszytometrischen Analysen in Passage 10 einen niedrigeren oder zumindest gleichbleibenden CD-Marker Anteil positiver Zellen erwarten. Dies wurde von Izadpanah et al. (2006) beschrieben. Daher kann man sich zunächst den erhöhten Anteil der Marker positiven Zellen in Passage 10, im Vergleich zur Passage 3 anhand dieser Studien nicht erklären. Mitchell et al. (2006) beschreiben eine Abhängigkeit der CD-Marker Expression von der Anzahl der Passagen. Sie entdeckten einen initial geringeren Anteil stammzellassoziierter CD Marker, in frisch prozessierten Zellen bzw. in niederen Passagen, so dass eine selektive Vermehrung bestimmter Zellpopulationen in höheren Passagen denkbar wäre. Eine Verunreinigung der frühen Passagen durch ebenfalls adhäsiv schnell wachsende Fibroblasten wäre ebenfalls möglich. Fibroblasten wachsen unter ähnlichen Bedingungen in vitro und ihr CD-Marker Profil, sowie ihre Morphologie lassen sich nicht eindeutig von fettabgeleiteten Stammzellen unterscheiden (Haniffa et al. 2007). Dies würde auch die wesentlich längeren Zellzyklen in den höheren Passagen 8-10 erklären, da mesenchymale Stammzellen sich langsamer vermehren. Izadpanah et al. (2006) beschreiben ebenfalls eine Abnahme der Zellverdopplungszeit in höheren Passagen.



### 5.2.2. Knochenvolumen und ossifizierte Defektfläche

Das auf equinem Kollagen basierende *scaffold* ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie nicht als Trägermaterial im *bone tissue engineering* der Ratte geeignet. Es lässt sich auch über längere Zeit problemlos mit ADSC kultivieren und nimmt die Zellen durch seine Poren auf. Jedoch verändert es seine Struktur im Kulturmedium und wird instabil. Aufgrund seiner schnellen Resorption in vivo ist es in dem vorliegenden Modell als alleiniger Platzhalter mit ADSC nicht geeignet. Die Therapiegruppe mit pbh und *scaffold* mit ADSC Transplantat hat eine schlechtere Knochenrekonstruktion gezeigt, als die Kontrolle mit ausschließlich pbh. Dieses Phänomen wird durch das schlechtere Abschneiden der Gruppe mit alleinigem Trägermaterial aus Kollagen, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Therapie, verstärkt. Diese Ergebnisse lassen einen störenden Effekt des *scaffold* selbst auf die Knochenheilung der Ratte vermuten. Es handelt sich um Dentalkegel, welche nach entfernen eines Zahnes in das leere Zahnfach zur Hämostase eingefügt werden und um ein Gerüst als Leitschiene zur Neubildung von Blutgefäßen und Knochenstrukturen zu haben. Die Vorteile dieser Art des Trägermaterials, wie die Osteokonduktivität, stabile Struktur und der Schutz des Defektes vor Weichgewebevorfall, sowie eine rasche Integration im umliegenden Gewebe können in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Die Dentalkegel sind für eine Knochenheilung im menschlichen Zahnfach konstruiert und werden aufgrund der erhöhten Stoffwechselrate der Ratte wesentlich schneller als beim Menschen abgebaut. Daher sollten diese neuartigen modifizierten Dentalkegel für zukünftige Arbeiten an Tiermodellen zu dieser Verwendung nicht mehr herangezogen werden. Die hohe osteogene Potenz der transplantierten ADSC ist besonders gut an den Gruppen mit Kollagentransplantat zu beobachten, da die Therapiegruppe mit *scaffold* und ADSC Transplantat eine bedeutend bessere Knochenheilung zeigt, im Vergleich zur Kontrolle mit ausschließlich *scaffold*.

Der autologe Knochen wird in nahezu jeder Publikation, welche sich mit der Problematik der Knochenregeneration beschäftigt, als der optimale Knochenersatz angesehen (Giannoudis et al. 2005; Horch und Pautke 2006). Zuverlässigkeit, Verfügbarkeit, Wirksamkeit und das Fehlen von potentiellen Krankheitsübertragungen machen den autologen Knochen zum „Goldstandard“ (St John et al. 2003). Die Stärken des autologen Knochentransplantats bestehen in den osteogenetischen, osteokonduktiven und osteoinduktiven Eigenschaften. Auch in der vorliegenden Studie ist die Überlegenheit eines autologen Knochentransplantates im Bereich der Knochenrekonstruktion belegt worden. Sowohl das Knochenvolumen wie auch die ossifizierte Defektfläche sind über den gesamten Untersuchungszeitraum den anderen Transplantatgruppen

überlegen. Das komplett entnommene Knochengewebe wird zerkleinert und reimplantiert und damit sind bis zu 80 % der Defektfläche schon zu Beginn der Studie mit Knochenmaterial gefüllt. Neu gebildeter Knochen und reimplantierter Knochen konnten aufgrund der Auswertungsmethode dieser Studie nicht unterschieden werden. Sowohl das Knochenvolumen wie auch die Defektfläche nehmen nur geringfügig innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu. Das osteogene Potential dieses Transplantates bleibt somit sehr gering. In den ADSC Transplantatgruppen ist zu Beginn der Untersuchung kein Knochenmaterial im Defektbereich vorhanden und besonders in der Gruppe mit pbh und ADSC Transplantat in Fibrinkleber, zeigt sich eine Knochenvolumenzunahme und eine ossäre Durchbauung des Defektbereiches, welche an die Ergebnisse der Transplantatgruppe mit autologem Knochenmaterial heranreichen.

Aufgrund der sehr ähnlichen Ergebnisse der Untersuchungen der ossifizierten Defektfläche und des Knochenvolumens im *critical size defect* liegt es nahe, dass der erhobene Parameter ossifizierte Defektfläche sehr stark von dem Wert des neu gebildeten Knochenvolumens im Defektbereich abhängig ist. Hier wird ein hoher Korrelationswert von 0,7 erreicht. Dies ist größtenteils auf die durch die makroporöse resorbierbare Folie hervorgerufene gerichtete Knochenheilung im Defektbereich zurückzuführen. Die ossifizierte Defektfläche wird berechnet, um durch einen zusätzlichen Parameter eine Aussage über die funktionelle Ausrichtung des neu gebildeten Knochenmaterials und damit der Stabilität im Defektbereich machen zu können.

Die vorliegende Arbeit dokumentiert als erste über einen Zeitraum von acht Wochen die Knochenheilung im *critical size defect* am Unterkieferwinkel der rnu-Ratte, durch Transplantation fettabgeleiteter humaner adulter Stammzellen. Somit ist eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Knochenregeneration möglich. Die Knochenregeneration im Defektbereich bzw. das neu gebildete Knochenvolumen der ADSC-Transplantatgruppen, übersteigen die Werte der Kontrollgruppe zwischen der 2. und 4. Woche. Zuvor liegt eine nahezu identische Knochenvolumenzunahme vor. Da in dieser Studie undifferenzierte ADSC verwendet werden, ist es denkbar, dass die Ausdifferenzierung der Stammzellen in vitro eine Zeit von bis zu drei Wochen in Anspruch nimmt. Studien, welche sich mit der Ausdifferenzierung der ADSC in vivo beschäftigen, beschreiben ebenfalls eine Ausdifferenzierungszeit von 2-3 Wochen (Yoon et al. 2007; Jeon et al. 2008). Man sollte daher in Betracht ziehen, die Zellen in vitro osteogen zu differenzieren, um die Zeitspanne von der undifferenzierten ADSC Zelle zur Knochenzelle in vivo so kurz wie möglich zu halten. Für eine osteogene Vordifferenzierung in vitro gibt es in der Literatur standardisierte Protokolle, in denen man durch Zugabe von Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und

Ascorbinsäure-2-phosphat zum normalen Zellexpansionsmedium, eine Differenzierung in die Knochenzelllinie bewirken kann (Pittenger et al. 1999; De Ugarte et al. 2003; Arrigoni et al. 2009; Lin et al. 2006; Wu et al. 2007). Diese Überlegungen werden von Yoon et al. (2007) unterstützt, die eine signifikant höhere Knochenregeneration mit vordifferenzierten ADSC-Transplantaten in einem *critical size defect* an der Schädelkalotte der Ratte im Vergleich zu undifferenzierten ADSC-Transplantaten beschreiben.

Am Verlauf der Knochenvolumenzunahme, wie auch der ossifizierten Defektfläche, ist zu dem Zeitpunkt nach acht Wochen Heilungsphase eine hohe Steigung zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass die Knochenheilung und damit auch die osteogene Potenz der Transplantate nach acht Wochen Heilungsphase in diesem Rattenmodell nicht abgeschlossen ist. Daher sollte man in zukünftigen Studien im Bereich der Knochenregeneration in einem Rattenmodell einen längeren Beobachtungszeitraum wählen. Die Kurvenverläufe lassen einen Abschluss der Knochenheilung nach 12-14 Wochen vermuten.

### 5.2.3. Histologie

In den histologischen Untersuchungen kann man eindeutig nachweisen, dass keiner der Defekte kritischer Größe ohne Therapie vollständig knöchern durchbaut ist. Lediglich im Randbereich ist eine knöcherne Regeneration zu beobachten. Dies ist hauptsächlich auf die Störungen durch einen Vorfall von Muskelgewebe in die Defektregion zurückzuführen. Diese massiven Störungen der Knochenregeneration werden durch Schutz des Defektes mit einer makroporösen resorbierbaren Folie unterbunden. Die Folien werden auf 5,5mm Durchmesser mit einer zentral gelegenen Membranpore zugeschnitten, welche die Vaskularisierung und damit die Versorgung der Defektregion sicherstellen sollte. Durch diese Pore sind teilweise Weichteilgewebe in den *critical size defect* vorgefallen und haben die Knochenheilung gestört. In einigen Präparaten ist ein Verrutschen der Folien zu erkennen, so dass der Defekt nicht mehr komplett abgedeckt wurde. Trotz dieser Störungen der Knochenregeneration kann man histologisch eine erheblich bessere Knochenheilung in den Defekten mit *protected bone healing* feststellen. Eine komplette knöcherne Durchbauung des Defektes innerhalb von sechs bzw. acht Wochen postoperativ, kann im Gegensatz zu Dahlin et al. (1988) nicht beobachtet werden. Um die Gewebefälle vollständig zu unterbinden, aber die nutritive Versorgung des Defektbereichs zu erhalten, könnte man eine milliporöse oder semipermeable resorbierbare Folie verwenden. Studien berichten über einen ähnlichen Erfolg des pbh mit milliporösen oder semipermeablen resorbierbaren Membranen (Rüedi und Bassett 1967). Auch Linde et al. (1993) schlagen die Anwendung von Barrieremembranen im

pbh mit erhöhter Porosität vor. Im Gegenteil berichten Schmid et al. (1994), dass die Membranpermeabilität keinen Einfluss auf die Knochenbildung hat.

In den histologischen Präparaten sind vermehrt Fettgewebe in den Defektbereichen aufgetreten, dieses war besonders in den Präparaten mit ADSC-Transplantat in Kollagenscaffold zu beobachten. Die Adipozyten können aus abgeschwemmtem Fettmark des Unterkiefers stammen, jedoch ist die lineare Anordnung entlang einer Linie von Defektrand zu Defektrand, auf der ursprünglich das *scaffold* zu vermuten ist, sehr auffällig. Es könnte sich um transplantierte humane ADSC handeln, welche sich in die Fettzelllinie, aus der sie ursprünglich isoliert wurden, ausdifferenziert haben. Da undifferenzierte Stammzellen transplantiert werden und die Bildung und Regeneration von jedem Gewebe mit einer Kaskade von assoziierten Signalen wie Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren einhergeht (Witkowska-Zimny und Walenko 2011), ist eine Differenzierung der multipotenten Stammzellen in Zelllinien abseits der des Knochens denkbar. Dies wäre durch eine vorherige osteogene Ausdifferenzierung *in vitro* zu vermeiden. Die Mechanismen, welche hinter der ADSC Differenzierung *in vivo* stehen, sind nicht geklärt. Weitere experimentelle Arbeiten sind erforderlich, um einen Einblick in das Zusammenspiel der Faktoren und Signalkaskaden im Prozess der Zelldifferenzierung und Reifung zu bekommen (Witkowska-Zimny und Walenko 2011). In den histologischen Präparaten in denen ein Kollagenscaffold verwendet wird (Gruppe 4 und 5), sind bis auf wenige Ausnahmen keine Reste des Trägermaterials zu finden. Auch die geringe Knochenregeneration im Defektbereich während des gesamten Untersuchungszeitraumes, spricht für eine sehr schnelle Resorption des Kollagenmaterials. In den Gruppen ohne pbh ist daher eine Störung der Knochenregeneration durch Vorfall von Weichteilgewebe in den *critical size defect* zu vermuten. Aufgrund des schnellen Abbaus wird ein Einsatz von Kollagenmaterial im *bone tissue engineering* auch von anderen Arbeitsgruppen kritisch gesehen (Donzelli et al. 2007). Man kann Kalzium-Phosphatkeramiken als Trägermaterial für humane ADSC verwenden. Tricalciumphosphat (TCP) ist stabil, bioresorbierbar und biokompatibel, aber hat eine unzulängliche Durchlässigkeit und Porosität (Parikh 2002). Hydroxylapatit (HA) hat eine kristalline Struktur und ist selbst in wässriger Lösung sehr stabil. Die meisten Produkte im Knochenersatz bestehen aus HA aufgrund seiner Stabilität (Bohner 2000). In verschiedenen Studien (Lee et al. 2003; Hicok et al. 2004; Kasten et al. 2004) wurde die erfolgreiche Kultivierung, Transplantation und osteogene Ausdifferenzierung (Marino et al. 2009) von Stammzellen in solchen Trägermaterialien beschrieben. Die Methodik der Grauwertanalyse der

vorliegenden Studie könnte man nicht verwenden, um Tricalciumphosphat bzw. Hydroxylapatit von neu gebildetem Knochen zu unterscheiden.

### 5.2.4. Nachweis humaner Zellen

Sowohl immunhistochemische Analysen wie auch PCR Untersuchungen und DNA in situ Hybridisierung auf human-spezifische, repetitive Alu-Sequenzen, sind gängige Methoden um Zellen humanen Ursprungs im Tier nachzuweisen (Walker et al. 2003; Hicok et al. 2004; Moelker et al. 2007; Ono et al. 2007; Kasten et al. 2008; Niemeyer et al. 2008, 2010). Es werden verschiedene Methoden verwendet und entwickelt, um die humane Zellpopulation in den fixierten Präparaten nachzuweisen bzw. um Osteoblasten und Osteozyten humanen Ursprungs in der Defektregion zu identifizieren. Zunächst werden immunhistologische Präparate mit Antikörpern gegen humane Zellkernbestandteile und humane Mitochondrien (Millipore, Schwalbach/Ts, Deutschland) unter verschiedenen Protokollen angefertigt. Beide Antikörper färben fixierte Stammzellpellets, welche direkt aus der Kultur entnommen wurden, eindeutig an. Die immunhistologischen Präparate der Unterkieferdefekte zeigen eine stärkere Färbung von Zellen der Knochenzelllinie in den ADSC Transplantatgruppen. Die Rattenzellen in den Negativkontrollen ohne ADSC Transplantat zeigen auch nach mehrmaligen Veränderungen der Färbeprotokolle eine Kreuzreaktivität. Daher kann kein Nachweis geführt werden.

Es wird eine PCR (*polymerase chain reaction*) von Schnitten der in Paraffin eingebetteten Präparate mit spezifischen Primern (mtHumsp\_F und mtHumsp\_R (Ono et al. 2007)) für humane mitochondriale DNA Sequenzen durchgeführt, um zunächst eine generelle Aussage über das Vorhandensein humaner DNA in den Präparaten zu bekommen. Die Signalstärke der Banden ist sehr gering und der Primer sehr unspezifisch. Andere PCR-Universalsysteme mit Primern (MMdl6\_F: ACCATCAGCACCCAAAGCTGA und MMdl6\_R: GCCCTGAAGTAAGAACCAGATGC) für tierische und menschliche DNA zeigen eine Vielzahl von Verunreinigungen durch tierisches Material rattenfremder Spezies, hervorgerufen durch die histologische Präparation in der Veterinärpathologie. Aufgrund dieser Verunreinigungen hat man sich entschieden eine sogenannte Nested PCR mit spezifischen Primern für humane DNA-Sequenzen durchzuführen. Dazu setzt man das PCR Produkt einer ersten PCR, im vorliegenden Fall die Midi-Primer F16088: TGTATTTTCGTACATTACTGC und R16304: ACTGTTAAGGGTGGGTAGGT, in eine zweite ein. Das Primerpaar der zweiten PCR, im vorliegenden Fall die Midi-Primer F16159: CATAAAAACCCAATCCACAT und R16233: TGATAGTTGAAGGTTGATTGCTGT, liegt dabei zwischen den Primern der ersten Reaktion.

Dadurch werden falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert. Diese Art der PCR ist sehr spezifisch und man benötigt nur geringe Mengen DNA-Material. Hier zeigt sich eine Verunreinigung der leeren Paraffinblöcke mit humaner DNA, sodass man von generellen Verunreinigungen des Einbettmaterials ausgehen musste. Es zeigen sich in einigen Präparaten mit ADSC Transplantat starke Signalbanden humaner DNA Sequenzen. Weitere Präparate mit ADSC Transplantat haben keine Signalbanden. Ebenfalls zeigen Kontrollpräparate ohne ADSC Transplantat leichte Signalbanden, welche aber auf Verunreinigungen des Präparates selbst oder des Einbettmaterials zurückzuführen wären. Der Nachweis der humanen Zellen in den Endpräparaten ist in ersten Pilotversuchen nicht eindeutig gelungen und wurde daher nicht weiterverfolgt, jedoch lassen die sonstigen Ergebnisse eindeutig auf den positiven Einfluss der ADSC auf die Knochenregeneration schließen. Der endgültige Nachweis, dass das neu gebildete Knochengewebe im Defektbereich aus transplantierten ADSC entstanden ist, ist mit diesen Präparaten nicht möglich. Bei der Planung und Durchführung der Studie ist ein alleiniger immunhistologischer Nachweis vorgesehen. Eine spätere Untersuchung mittels PCR ist nicht geplant gewesen. Daher wird bei der Präparation nicht ausreichend sauber für eine PCR gearbeitet. Eine in situ Hybridisierung auf human-spezifische, repetitive Alu-Sequenzen wird nicht durchgeführt, da eine in der vorliegenden Studie durchgeführte PCR auf solche Sequenzen, Intra\_Aluc\_F und Intra\_Aluc\_R (Walker et al. 2003), keine Ergebnisse erbrachte. Dies ist eventuell durch einen negativen Einfluss der EDTA-Entkalkung auf die DNA zu erklären. Ein Nachweis ist nun in Folgestudien zu erbringen. Hierzu gehen Überlegungen zu einem Rattenmodell mit autologer ADSC Transplantation. Denkbar wäre eine Markierung der transplantierten ADSC mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) zur späteren Identifizierung (Inoue et al. 2005).

### 5.3. Ausblick für Veterinär- und Humanmedizin

Die regenerative Medizin weckt mit der Entwicklung vitalisierter Ersatzmaterialien große Hoffnung für künftige Behandlungsmethoden ausgedehnter Knochendefekte. Im Vorfeld der Übertragung auf die Klinik gilt es jedoch, Materialien eingehend zu testen, um das Risikoprofil neuartiger Implantate besser abschätzen zu können. Dies besitzt für die Veterinär- und Humanmedizin gleichermaßen Gültigkeit. Jede Material-Stammzell-Kombination sollte daher vor dem in vivo Einsatz auf ihre Zytokompatibilität getestet werden. Auch die Differenzierbarkeit einer Stammzelle auf einem Material muss in nachfolgenden Versuchen getestet werden. Um eine osteogene Differenzierung der ADSC zu induzieren, mussten in den bisherigen Arbeiten noch zusätzliche

## 5. Diskussion

---

Differenzierungsstimuli eingesetzt werden. Zukünftige Forschungsarbeiten werden die langfristige und stabile osteogene Differenzierung auf Biomaterialien betreffen.

Insgesamt betrachtet wird sich nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft aller Voraussicht nach keiner der in dieser Studie dargestellten Ansätze zur Verbesserung des Ersatzes knöchernen Gewebes alleine durchsetzen können. Jedoch konnte man mit der vorliegenden Studie richtungsweisende Ergebnisse erzielen, welche sowohl für die Human- als auch für die Veterinärmedizin große Hoffnungen im Bereich der Regenerativen Medizin wecken. Durch die synergistische Nutzung der Kompetenzen verschiedener Fachrichtungen scheint es erreichbar, die effektivsten Therapiestrategien für die Behandlung ausgedehnter Knochendefekte durch Kombination unterschiedlicher Ansätze zu identifizieren. Das übergeordnete Ziel bleibt dabei die Behandlung von Knochendefekten mit Ergebnissen, die der Verwendung autologer Transplantate gleichkommen. Auch wenn vor einem klinischen Einsatz noch erheblicher Entwicklungsbedarf besteht, können basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit neue Maßnahmen ergriffen werden, um patientenindividuelle vitalisierte Knochenersatzmaterialien weiterzuentwickeln und in präklinischen Tiermodellen zu testen, beziehungsweise um zunächst im Rahmen individueller Heilversuche vitalisierte Knochenersatzmaterialien für die Therapie ausgedehnter Knochendefekte zu nutzen. Auf diese Weise kann neuen Materialien und Behandlungsmethoden für den Knochenersatz der Weg in die klinische Anwendung geebnet werden. Für eine wirtschaftliche klinische Anwendung dieser Techniken wäre es nötig, die material- und zeitaufwändige Laborphase zu optimieren und die Kosten zu senken. In der Humanmedizin wäre es sinnvoll auf dem Weg zur breiten Anwendung die Vorteile der günstigen und beschwerdefreien Materialgewinnung in Form eines Lipoaspirates mit einem flächendeckenden Netz von Fettgewebsdatenbanken zu kombinieren. Bis zu diesem Punkt bleibt die Verwendung fettabgeleiteter Stammzellen eine Einzelanwendung und muss gegen den Einsatz herkömmlicher Knochenersatzmaterialien oder der Verwendung eines autologen Knochentransplantates abgewogen werden. Somit stellt diese Studie mit der knöchernen Defektheilung durch fettabgeleitete Stammzellen in Kombination mit Fibrin als Trägermaterial ein bioaktives Knochenersatzmaterial vor, dessen weitere Erforschung hin zu verlässlichen Heilergebnissen und beständiger Qualität empfohlen werden kann. Darüber hinaus ist eine Anwendung therapeutisch am Tier und Menschen wünschenswert. Besonders die Knochenheilung in der veterinärmedizinischen Chirurgie kann vom Einsatz regenerativer Prinzipien profitieren. Speziell Non-Unions, also letztlich die Ausbildung von Pseudarthrosen, sind ein großes Problem in diesem Bereich. Aber auch Knochendefekte in der Unfallchirurgie sind nur sehr unbefriedigend zu

## 5. Diskussion

---

versorgen. Beim Pferd und Hund sind es z.B. Arthrodesen, die in sehr variabler Frist knöchern durchbauen, welche durch neuartige in dieser Studie vorgestellt bone tissue engeneering Verfahren besser therapiert werden könnten. Im Bereich der Kleintiermedizin könnten größere Knochendefekte am Unterkiefer der Katze mittels neuer tissue engeneering Verfahren in Kombination mit ADSC zu deutlich schnellerer Ausheilung beitragen und somit die Lebensqualität des Tieres verbessern und das Überleben sichern. Damit zeigt sich, dass auch in der Veterinärmedizin ein erhöhtes Interesse an modernen Methoden der Knochenregeneration besteht. Durch das tissue engineering mit vitalen ADSC in Trägermaterialien werden somit auch der Veterinärmedizin neue Möglichkeiten zur Behandlung von Knochendefekten eröffnet.



### 6. Zusammenfassung

Durch die Kombination biokompatibler Trägerstoffe (Kollagen und Fibrin) mit undifferenzierten humanen fettabgeleiteten Stammzellen (*adipose derived stem cells*, ADSC), soll ein vitales Knochenersatzmaterial entwickelt werden, um die osteogene Potenz der ADSC in vitro zu evaluieren. Weiterhin soll eine mögliche Alternative zum limitierten autologen Knochentransplantat als „Goldstandard“ im Knochenremodelling beim kleinen Haussäugetier bzw. bei Kindern gefunden werden. ADSC stellen eine gut zugängliche Alternative zu den bekannten und weit verbreiteten Knochenmarkstammzellen (*bone marrow stem cells*, BMSC) dar. ADSC zeichnen sich in vitro durch eine exzellente Proliferationsfähigkeit und eine mit BMSC vergleichbare Differenzierungsfähigkeit aus. In vivo Studien zum Einsatz dieser Zellquelle in Kombination mit Fibrinkleber oder Kollagenträgermaterial in einem xenogenen Transplantatmodell im critical size Defektmodell am Unterkiefer der immuninkompetenten Ratte (CrI:NIH-Foxn1<sup>mu</sup>) existieren bisher nicht.

Durch den Nachweis einer stammzellspezifischen Oberflächenmarkerexpression der isolierten Zellen kann in dieser Studie eine erfolgreiche Isolierung humaner ADSC in vitro bewiesen werden. Am Unterkiefer der Ratte ist ein 5mm (Durchmesser) großer Defekt als Defekt kritischer Größe (*critical size defect*) definiert. Zur Defektfüllung werden ADSC in Kombination mit Fibrinkleber oder einem scaffold (Trägermaterial) aus Kollagen verwendet und mit einer Methode des protected bone healing (pbh), autologem Knochentransplantat und den Kontrollen ohne Therapie und scaffold ohne Zellen verglichen. Zur Beurteilung des zeitlichen Ablaufs der Knochenneubildung wurde am Tag der Operation und 1,2,4 und 8 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff radiologische Untersuchungen in vivo mit einem hochauflösenden flat-panel Volumen Computertomographen (fpvCT) durchgeführt und mit Hilfe von frei zugänglicher Software MicroView 2.1.2 (GE Health Care, New York, USA) und OsiriX Imaging Software 3.8.1 64 bit (Pixmeo SARL, Bernex, Schweiz) quantitativ ausgewertet. In Versuchsgruppe 1 zeigte die Methode des pbh zum Ende der Studie nach 8 Wochen Heilungsverlauf keine signifikant größere Knochenregeneration im Defektbereich im Vergleich zu Kontrolle ohne Therapie (Knochenvolumen  $p=0,389$ ; ossifizierte Defektfläche  $p=0,502$ ). Die Kombination von humanen ADSC mit Fibrinkleber und pbh zeigte in Versuchsgruppe 2 eine signifikant größere Knochenneubildung im Vergleich zur Kontrolle mit ausschließlich pbh (Knochenvolumen  $p=0,015$ ; ossifizierte Defektfläche  $p=0,019$ ). Auch die autologe Transplantatgruppe in Versuchsgruppe 3 zeigte eine signifikant größere

## 6. Zusammenfassung

---

Knochenregeneration im Vergleich mit der Kontrolle ohne Therapie (Knochenvolumen  $p=0,0003$ ; ossifizierte Defektfläche  $p=0,0001$ ). In der Versuchsgruppe 4 mit Kollagenscaffold und ADSC zeigt sich keine signifikant größere Knochenvolumenzunahme ( $p=0,133$ ) jedoch eine signifikant größere ossifizierte Defektfläche ( $p=0,006$ ) im Vergleich zur Therapieseite mit ausschließlich Kollagenscaffold. In der Versuchsgruppe 5 mit ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und pbh zeigte sich keine signifikant größere Knochenregeneration im Vergleich zur Therapieseite mit ADSC in Kombination mit Kollagenscaffold und pbh (Knochenvolumen  $p=0,724$ ; ossifizierte Defektfläche  $p=0,419$ ).

Nach 8-wöchiger Standzeit wurden die Tiere euthanasiert, der Unterkieferknochen explantiert und histologisch analysiert.

Die Beurteilung der mit Hämatoxylin-Eosin, nach Goldner und Masson-Trichrom gefärbten Schnitte erfolgte qualitativ. Auf der Kontrollseite ohne Therapie ist das umliegende Muskelgewebe in den Defekt vorgefallen und hat somit eine Knochenheilung in diesem Bereich erschwert. Auf der Therapieseite mit pbh sind diese vor dem umgebenden Weichteilgewebe geschützt. Es war in keinem der histologischen Schnitte eine komplette knöcherne Durchbauung des critical size defect zu erkennen. Die Therapieseiten mit ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und pbh zeigten eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich. In Versuchsgruppe 3 füllen die autologen Knochentransplantate den Defektbereich aus. Es handelt sich um vitale reife Knochenfragmente. In Versuchsgruppe 4 mit scaffold in Kombination mit ADSC oder ohne ADSC findet keine Knochenneubildung statt. Muskelgewebe ist in den Defektbereich vorgefallen und füllt diesen aus. In Versuchsgruppe 5 zeigt die Therapieseite mit ADSC in Kombination mit Kollagenscaffold und pbh eine qualitativ gute Knochenregeneration im gesamten Defektbereich.

Die vorliegende Studie zeigt, dass sich ADSC in Kombination mit Fibrinkleber und protected bone healing für den Einsatz im bone tissue engineering eignen.

### 7. Summary

Using a combination of a biocompatible scaffold (collagen and fibrin) and undifferentiated human adipose-derived stem cells (ADSC), this study attempt to develop a vital bone substitute to evaluate the osteogenic potency of ADSC in vitro. Furthermore, a possible alternative to limited autologous bone graft as the gold standard in bone remodeling in small animals and children is sought. ADSC represent an easily accessible alternative to bone marrow-derived stem cells (BMSC). ADSC are characterized by excellent proliferation with a differentiation capacity comparable to BMSC. There have been no previous in vivo studies to evaluate the use of this cell source in combination with fibrin glue or collagen scaffold in a xenogenic transplantation model in a critical-size defect of the immunoincompetent rat mandible (CrI: NIH-Foxn1<sup>tmu</sup>).

Stem cell-specific surface marker expression of the isolated cell population is determined in this study. A defect 5-mm in diameter in the rat mandible is defined as a critical-size defect. To bridge the defect, ADSC are used in combination with fibrin glue or a collagen scaffold and the protected bone healing (pbh) method, and the results were compared with autologous bone graft, controls without therapy, and scaffold without cells. To document the in vivo healing process, high-resolution flat-panel volume computed tomography (fpvCT) is performed on the day of surgery and 1, 2, 4, and 8 weeks thereafter; quantitative analysis is performed using the open source software programs MicroView 2.1.2 (GE Healthcare, New York, NY, USA) and OsiriX Imaging software 3.8.1 64-bit (Pixmeo SARL, Bernex, Switzerland). In treatment group 1 at the endpoint of the study (8 weeks post-surgery), there is no significant difference in bone regeneration on the pbh side compare to the control side ( $p = 0.389$  bone volume,  $p = 0.502$  ossified defect area). However, the combination of human ADSC with fibrin glue and pbh (treatment group 2) show significantly increase bone formation compare with pbh alone (bone volume  $p = 0.015$ ; ossified defect area  $p = 0.019$ ). In treatment group 3, the autologous bone graft side show significantly increase bone regeneration compare to the control side (bone volume  $p = 0.0003$ ; ossified defect area  $p = 0.0001$ ). There is no significant difference in bone volume in treatment group 4 between the collagen scaffold sides with and without ADSC, but significantly more ossified defect area ( $p = 0.006$ ). In treatment group 5, the ADSC in combination with fibrin glue and pbh side show significantly increase bone regeneration compare to the ADSC in combination with collagen scaffold and pbh side (bone volume  $p = 0.724$ , ossified defect area  $p = 0.419$ ).

## 7. Summary

---

The animals are sacrificed 8 weeks after surgery, and the specimens are explanted for histological analysis. Sections stain with hematoxylin-eosin, Goldner, and Masson's Trichrome are subjected to qualitative evaluation. In the control side of all evaluate specimens, the surrounding muscle tissue prolapse into the defect. On the treatment with pbh side, the defect is protected from the surrounding muscle tissue. Complete ossification of the defect area is not observed in any of the specimens. The treatment side with ADSC in combination with fibrin glue and pbh show complete ossification in the whole defect area. The autologous bone graft fills the defect with vital bone fragments. No bone regeneration is detected in treatment group 4 with only collagen scaffold or in combination with ADSC. Here, muscle tissue prolapse into the defect area. In treatment group 5, the specimens with ADSC in combination with collagen scaffold and pbh show complete ossification of the defect area with thick, newly formed bone.

The results of this study indicate that treatment with ADSC in combination with fibrin glue and pbh is suitable for bone tissue engineering.

## Literaturverzeichnis

Ahmed, T. A. E., Dare, E. V., und Hincke, M. (2008). „Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications“. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(2), 199–215.

Ahrendt, G., Chickering, D. E., und Ranieri, J. P. (1998). „Angiogenic Growth Factors: A Review for Tissue Engineering“. *Tissue Engineering*, 4(2), 117–130.

Albrektsson, T., Bach, A., Edshage, S., und Jönsson, A. (1982). „Fibrin adhesive system (FAS) influence on bone healing rate: a microradiographical evaluation using the bone growth chamber“. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 53(5), 757–763.

Alving, B. M., Weinstein, M. J., Finlayson, J. S., Menitove, J. E., und Fratantoni, J. C. (1995). „Fibrin sealant: summary of a conference on characteristics and clinical uses“. *Transfusion*, 35(9), 783–790.

Arrigoni, E., Lopa, S., de Girolamo, L., Stanco, D., und Brini, A. (2009). „Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models“. *Cell and Tissue Research*, 338(3), 401–411.

Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., und Davino, N. A. (1996). „Complications of iliac crest bone graft harvesting“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (329), 300–309.

Artzi, Z., Nemcovsky, C. E., und Tal, H. (2001). „Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: clinical observations and literature review“. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 21(4), 395–405.

Ashjian, P. H., Elbarbary, A. S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P. A., Lorenz, H. P., Benhaim, P., und Hedrick, M. H. (2003). „In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 111(6), 1922–1931.

Ashley, F. L., Stone, R. S., Alonsoartieda, M., Syverud, J. M., Edwards, J. W., Sloan, R. F., und Mooney, S. A. (1959). „Experimental and clinical studies on the application of monomolecular cellulose filter tubes to create artificial tendon sheaths in digits“. *Plastic and Reconstructive Surgery and the Transplantation Bulletin*, 23(5), 526–534.

ASTM, A. S. F. (2008). „Standard Guide for Preclinical In Vivo Evaluation in Critical Size Segmental Bone Defects“. *astm.org*.

Auquier, P., Macquart-Moulin, G., Moatti, J. P., Blache, J. L., Novakovitch, G., Blaise, D., Faucher, C., Viens, P., und Maraninchi, D. (1995). „Comparison of anxiety, pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: leukocytapheresis and bone marrow harvest“. *Bone Marrow Transplantation*, 16(4), 541–547.

Babbush, C. A. (2001). „Dental implants: the art and science“. Elsevier Health Sciences, 107–123.

- Bartee, B. K., und Carr, J. A. (1995). „Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible“. *The Journal of Oral Implantology*, 21(2), 88–95.
- Bauer, T. W., und Muschler, G. F. (2000). „Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science“. *Clinical Orthopaedics & Related Research February 2000*, 10–27.
- Böchter, A., Kleinheinz, J., Wiesmann, H.-P., Seper, L., Joos, U., und Meyer, U. (2004). „Tierexperimentelle Evaluation des periimplantären Knochens bei zylindrischen gegenüber konischen Implantattypen“. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 8(5), 282–288.
- Beier, H. M. (2002). „Zur Forschung an menschlichen embryonalen Stammzellen und Embryonen“. *Reproduktionsmedizin*, 18(1), 25–31.
- Bellantuono, I. (2004). „Haemopoietic stem cells“. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 607–620.
- Bellows, J. (2004). „Small animal dental equipment, materials, and techniques: a primer“. Wiley-Blackwell, 297–328.
- Berchtold, R. (2008). „Chirurgie“. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 342–345.
- Bernstein, P., Bornhäuser, M., Günther, K.-P., und Stiehler, M. (2009). „Knochen-Tissue-Engineering in der klinischen Anwendung“. *Der Orthopäde*, 38(11), 1029–1037.
- Berridge, M. V., O’Kech, N., McNeilage, L. J., Heslop, B. F., und Moore, R. (1979). „Rat mutant (NZNU) showing ‚nude‘ characteristics“. *Transplantation*, 27(6), 410–413.
- Bettega, G., Brun, J.-P., Boutonnat, J., Cracowski, J.-L., Quesada, J.-L., Hegelhofer, H., Drillat, P., und Richard, M. J. (2009). „Autologous platelet concentrates for bone graft enhancement in sinus lift procedure“. *Transfusion*, 49(4), 779–785.
- Blum, H. E. (2007). „Stammzellen – Grundlagen und therapeutische Perspektiven“. *Praxis*, 96(14), 539–543.
- De Boer, H. (1988). „The History of Bone Grafts“. *Clinical Orthopaedics & Related Research January 1988*, 292–298.
- Bohner, M. (2000). „Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements“. *Injury*, 31(Supplement 4), D37–D47.
- Bosch, C., Melsen, B., und Vargervik, K. (1998). „Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials“. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 9(4), 310–316.
- Bösch, P., Braun, F., und Eschberger, J. (1977). „Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin. Experimentelle Untersuchung am Kaninchen.“ *Arch Orthop Unfall Chir*, (89), 259–273.
- Bottaro, D., Liebmann-Vinson, A., und Heidaran, M. A. (2002). „Molecular Signaling in Bioengineered Tissue Microenvironments“. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(REPARATIVE MEDICINE: GROWING TISSUES AND ORGANS), 143–153.

- Brazelton, T. R., Rossi, F. M. V., Keshet, G. I., und Blau, H. M. (2000). „From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice“. *Science*, 290(5497), 1775–1779.
- Breusch, S. (2009). „Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie“. *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie*, Elsevier, Urban&FischerVerlag, 18–25.
- Brewe, M. (2006). *Embryonenschutz und Stammzellgesetz: rechtliche Aspekte der Forschung mit embryonalen Stammzellen*. Springer.
- Brooks, C. G., Webb, P. J., Robins, R. A., Robinson, G., Baldwin, R. W., und Festing, M. F. (1980). „Studies on the immunobiology of rnu/rnu ‚nude‘ rats with congenital aplasia of the thymus“. *European Journal of Immunology*, 10(1), 58–65.
- Bruder, S. P., Fink, D. J., und Caplan, A. I. (1994). „Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy“. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56(3), 283–294.
- Brzoska, M., Geiger, H., Gauer, S., und Baer, P. (2005). „Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), 142–150.
- Del Bue, M., Riccò, S., Ramoni, R., Conti, V., Gnudi, G., und Grolli, S. (2008). „Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo“. *Veterinary Research Communications*, 32(0), 51–55.
- Burchardt, H. (1983). „The biology of bone graft repair“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (174), 28–42.
- Campbell, J. B., Bassett, C. A. L., Girado, J. M., Seymour, R. J., und Rossi, J. P. (1956). „Application of Monomolecular Filter Tubes in Bridging Gaps in Peripheral Nerves and for Prevention of Neuroma Formation“. *Journal of Neurosurgery*, 13(6), 635–637.
- Carstanjen, B., Desbois, C., Hekmati, M., und Behr, L. (2006). „Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse“. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 70(2), 143–147.
- Carter, G. (1999). „Harvesting and implanting allograft bone“. *AORN Journal*, 70(4), 660–670; quiz 672–676.
- Chang, S. C.-N., Chuang, H., Chen, Y.-R., Yang, L.-C., Chen, J.-K., Mardini, S., Chung, H.-Y., Lu, Y.-L., Ma, W.-C., und Lou, J. (2004). „Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells1“. *Journal of Surgical Research*, 119(1), 85–91.
- Chen, G., Ushida, T., und Tateishi, T. (2001). „Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates“. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57(1), 8–14.
- Coetzee, A. S. (1980). „Regeneration of bone in the presence of calcium sulfate“. *Archives of Otolaryngology (Chicago, Ill.: 1960)*, 106(7), 405–409.

- Coombes, A. G. A., und Meikle, M. C. (1994). „Resorbable synthetic polymers s replacements for bone graft“. *Clinical Materials*, 17(1), 35–67.
- Cornell, C. N. (1999). „Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts“. *The Orthopedic Clinics of North America*, 30(4), 591–598.
- Corre, J., Barreau, C., Cousin, B., Chavoin, J.-P., Caton, D., Fournial, G., Penicaud, L., Casteilla, L., und Laharrague, P. (2006). „Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors“. *Journal of Cellular Physiology*, 208(2), 282–288.
- Cowan, C. M., Shi, Y.-Y., Aalami, O. O., Chou, Y.-F., Mari, C., Thomas, R., Quarto, N., Contag, C. H., Wu, B., und Longaker, Michael T. (2004). „Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects“. *Nat Biotech*, 22(5), 560–567.
- Dahlin, C., Linde, A., Gottlow, J., und Nyman, S. (1988). „Healing of bone defects by guided tissue regeneration“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 81(5), 672–676.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J A, Tuck, S. P., und Varanasi, S. S. (2008). „The cell biology of bone metabolism“. *Journal of Clinical Pathology*, 61(5), 577–587.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., und Prockop, D. J. (2001). „In Vitro Differentiation of Human Marrow Stromal Cells into Early Progenitors of Neural Cells by Conditions that Increase Intracellular Cyclic AMP“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(1), 148–152.
- Dennis, J. E., Carbillet, J.-P., Caplan, Arnold I, und Charbord, P. (2002). „The STRO-1+ marrow cell population is multipotential“. *Cells, Tissues, Organs*, 170(2-3), 73–82.
- Deporter, D. A., Komori, N., Howley, T. P., Shiga, A., Ghent, A., Hansel, P., und Parisien, K. (1988). „Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria“. *Calcified Tissue International*, 42(5), 321–325.
- Develioğlu, H., Saraydin, S. U., Bolayir, G., und Dupoirieux, Laurent. (2006). „Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model“. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 77(3), 627–631.
- Döhmen, G., und Reis, H. E. (2002). „Stammzellen: Forschung im Überblick“. *Deutsches Ärzteblatt*, 99(41), 2680–2682.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., und Horwitz, E. (2006). „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement“. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Donzelli, E., Salvadè, A., Mimo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M., und Tredici, G. (2007). „Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation“. *Archives of Oral Biology*, 52(1), 64–73.



- Douglas-Jones, A., Nelson, J., Jansen, V., und Miller, T. (1981). „Characterization of the (rnunz) nude rat. Morphological characteristics of the lymphoid system“. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 59(Pt 3), 277–286.
- Dragoo, J. L., Choi, J. Y., Lieberman, Jay R, Huang, J., Zuk, P. A., Zhang, J., Hedrick, M. H., und Benhaim, P. (2003). „Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat“. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 21(4), 622–629.
- Dudas, J. R., Marra, K. G., Cooper, G. M., Penascino, V. M., Mooney, M. P., Jiang, S., Rubin, J. P., und Losee, J. E. (2006). „The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects“. *Annals of Plastic Surgery*, 56(5), 543–548.
- Dupoirieux, L., Costes, V., Jammet, P., und Souyris, F. (1994). „Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery“. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 23(6 Pt 2), 395–398.
- Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, Ju, und Ding, S. (2011). „Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy“. *Nat Cell Biol*, 13(3), 215–222.
- Endres, S., und Kratz, M. (2009). „Gamma irradiation. An effective procedure for bone banks, but does it make sense from an osteobiological perspective?“ *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 9(1), 25–31.
- Endres, S., Kratz, M., Heinz, M., Herzberger, C., Reichel, S., von Garrel, T., Gotzen, L., und Wilke, A. (2005). „Biokompatibilitätstestung unterschiedlich sterilisierter bzw. desinfizierter allogener Knochentransplantate im Vergleich zum Goldstandard der autologen Knochenspende - Eine „In-vitro“-Analyse der Immunmodulation“. *Zeitschrift für Orthopädie*, 143(6), 660–668.
- Erben, R. G. (1996). „Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling?“ *The Anatomical Record*, 246(1), 39–46.
- Erickson, G. R., Gimble, Jeffrey M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., und Guilak, Farshid. (2002). „Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(2), 763–769.
- Ewers, R., Turhani, C. B., Item, C. B., Kapral, D., Thurnher, D., Cvikl, B., Weissenböck, M. M., Erovic, B. M., und Lauer, G. (2003). „„Bioengineered Knochen Produktion“ – Aktuelle Anwendungen des Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie“. *Zahnärztl Impl*, 19(4), 216–220.
- Ferrari, G. (1998). „Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors“. *Science*, 279(5356), 1528–1530.
- Festing, M. F., May, D., Connors, T. A., Lovell, D., und Sparrow, S. (1978). „An athymic nude mutation in the rat“. *Nature*, 274(5669), 365–366.
- Fialkov, J. A., Holy, C. E., Shoichet, M. S., und Davies, J. E. (2003). „In vivo bone engineering in a rabbit femur“. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 14(3), 324–332.

- Finkemeier, C. G. (2002). „Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes.“ *Journal of Bone & Joint Surgery, American Volume*, 84(3), 454.
- Fleming, J. E., Cornell, C. N., und Muschler, G. F. (2000). „Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering“. *The Orthopedic Clinics of North America*, 31(3), 357–374.
- Follmar, K. E., Decroos, F. C., Prichard, H. L., Wang, H. T., Erdmann, D., und Olbrich, K. C. (2006). „Effects of glutamine, glucose, and oxygen concentration on the metabolism and proliferation of rabbit adipose-derived stem cells“. *Tissue Engineering*, 12(12), 3525–3533.
- Fortier, L. A. (2005). „Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications“. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423.
- Fossum, S., Smith, M. E., Bell, E. B., und Ford, W. L. (1980). „The Architecture of Rat Lymph Nodes.“ *Scandinavian Journal of Immunology*, 12(5), 421–432.
- Fossum, T. W. (2008). „Chirurgie der Kleintiere“. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 985.
- Fotuhi, P., Song, Y.-H., und Alt, E. (2007). „Electrophysiological consequence of adipose-derived stem cell transplantation in infarcted porcine myocardium“. *Europace*, 9(12), 1218 – 1221.
- Frankenburg, E. P., Goldstein, S. A., Bauer, T. W., Harris, S. A., und Poser, R. D. (1998). „Biomechanical and Histological Evaluation of a Calcium Phosphate Cement“. *J Bone Joint Surg Am*, 80(8), 1112–24.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., und Frolova, G. P. (1968). „Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues“. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
- Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., und Petrakova, K. V. (1966). „Osteogenesis in transplants of bone marrow cells“. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 16(3), 381–390.
- Friedlaender, G. E. (1987). „Current concepts review: Bone grafts“. *J Bone Joint Surg*, 69A, 786–790.
- Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Dean Cole, J., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., Zych, G. A., Calhoun, J. H., Laforte, A. J., und Yin, S. (2001). „Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions“. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 83-A Suppl 1(Pt 2), S151–S158.
- Friedlaender, G. E., Strong, D. M., Tomford, W., und Mankin, H. J. (1999). „Longterm follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome“. *Orthop Clin North Am*, 30, 583–588.
- Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., Kawcak, C. E., Werpy, N. M., und McIlwraith, C. W. (2009). „Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis“. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12), 1675–1680.

- Gabbay, J. S., Heller, J. B., Mitchell, S. A., Zuk, P. A., Spoon, D. B., Wasson, K. L., Jarrahy, R., Benhaim, P., und Bradley, J. P. (2006). „Osteogenic Potentiation of Human Adipose Derived Stem Cells in a 3-Dimensional Matrix“. *Annals of Plastic Surgery*, 57(1), 89–93.
- Garcia-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, I., Pascual, J. A., Del-Valle, E., Zorrilla, J., De-La-Quintana, P., Garcia-Arranz, M., und Pascual, M. (2009). „Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial“. *Diseases of the Colon and Rectum*, 52(1), 79–86.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., und Einhorn, T. A. (2003). „Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation“. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 873–884.
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., und Kahn, C. R. (2007). „Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source“. *Cell*, 131(2), 242–256.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., und Tsiridis, E. (2005). „Bone substitutes: An update“. *Injury*, 36(3, Supplement 1), S20–S27.
- Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., und Marsh, D. (2007). „Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation?“. *Injury*, 38 Suppl 4, S1–2.
- Giannoudis, P. V., und Pountos, I. (2005). „Tissue regeneration. The past, the present and the future“. *Injury*, 36 Suppl 4, S2–5.
- Giannoudis, P. V., und Tzioupis, C. (2005). „Clinical applications of BMP-7: the UK perspective“. *Injury*, 36 Suppl 3, S47–50.
- Gimble, J. M. (2003). „Adipose tissue-derived therapeutics“. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(5), 705–713.
- Gimble, J. M., und Guilak, F. (2003). „Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential“. *Cytotherapy*, 5(5), 362–369.
- Goldberg, V. M., und Stevenson, S. (1987). „Natural History of Autografts and Allografts“. *Clinical Orthopaedics & Related Research December 1987*, 7–16.
- Green, D. W. (2008). „Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering“. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 3(3), 034010.
- Greschus, S., Kiessling, F., Lichy, M. P., Moll, J., Mueller, M. M., Savai, R., Rose, F., Ruppert, C., Günther, A., Luecke, M., Fusenig, N. E., Semmler, W., und Traupe, Horst. (2005). „Potential Applications of Flat-Panel Volumetric CT in Morphologic and Functional Small Animal Imaging“. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(8), 730–740.
- Griffith, L. G. (2002). „Emerging Design Principles in Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering“. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1), 83–95.
- Grifka, J., und Kuster, M. (2011). „Orthopädie und Unfallchirurgie“. *Orthopädie und Unfallchirurgie*, Springer, 377.

- Grinnemo, K. ., Månsson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringdén, O., Sylén, C., und Le Blanc, K. (2004). „Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium“. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127(5), 1293–1300.
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., und Gimble, Jeffrey M. (2001). „Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells“. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 54–63.
- Gronthos, S., Graves, S., Ohta, S., und Simmons, P. (1994). „The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors“. *Blood*, 84(12), 4164–4173.
- Gross, U., Brandes, J., Strunz, V., Bab, I., und Sela, J. (1981). „The ultrastructure of the interface between a glass ceramic and bone“. *Journal of Biomedical Materials Research*, 15(3), 291–305.
- Grünbaum, E. G., und Schimke, E. (2006). „Klinik der Hundekrankheiten“. *Klinik der Hundekrankheiten*, Georg Thieme Verlag, 885.
- Le Guéhennec, L., Layrolle, P., und Daculsi, G. (2004). „A review of bioceramics and fibrin sealant“. *European Cells & Materials*, (8), 1–11.
- Gugala, Z., und Gogolewski, S. (2002). „Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes“. *Injury*, 33 Suppl 2, B71–76.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M., und Mulligan, R. C. (1999). „Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation“. *Nature*, 401(6751), 390–394.
- Hak, D. J. (2007). „The Use of Osteoconductive Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma“. *J Am Acad Orthop Surg*, 15(9), 525–536.
- Hallfeldt, K. K. J., Stützel, H., Puhmann, M., Kessler, S., und Schweiberer, L. (1995). „Sterilization of Partially Demineralized Bone Matrix: The Effects of Different Sterilization Techniques on Osteogenetic Properties“. *Journal of Surgical Research*, 59(5), 614–620.
- Hallman, M., Lundgren, S., und Sennerby, L. (2001). „Histologic analysis of clinical biopsies taken 6 months and 3 years after maxillary sinus floor augmentation with 80% bovine hydroxyapatite and 20% autogenous bone mixed with fibrin glue“. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 3(2), 87–96.
- Halvorsen, Y.-D. C., Franklin, D., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O., und Gimble, Jeffrey M. (2001). „Extracellular Matrix Mineralization and Osteoblast Gene Expression by Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells“. *Tissue Engineering*, 7(6), 729–741.
- Hämmerle, C. H. F., und Jung, R. E. (2003). „Bone augmentation by means of barrier membranes“. *Periodontology 2000*, 33, 36–53.

- Haniffa, M. A., Wang, X.-N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J. D., Dickinson, A. M., Hilkens, C. M. U., und Collin, M. P. (2007). „Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells“. *The Journal of Immunology*, 179(3), 1595–1604.
- Hartmann, M., Pabst, M. A., Schmied, R., Caluba, H.-C., und Dohr, G. (2009). *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas*, Facultas Verlag, 34–40.
- Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, Miya, Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K., und Ishihara, Masayuki. (2006). „Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold“. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 76(1), 230–239.
- Hattori, H., Sato, M., Masuoka, K., Ishihara, Miya, Kikuchi, T., Matsui, T., Takase, B., Ishizuka, T., Kikuchi, M., Fujikawa, K., und Ishihara, Masayuki. (2004). „Osteogenic Potential of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as an Alternative Stem Cell Source“. *Cells Tissues Organs*, 178(1), 2–12.
- Hauschild, G., und Bader, A. (2004). „Vor- und Nachteile synthetischer versus xenogener Knochenersatzmaterialien“. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, (2), 67–70.
- Hecht, S. (2008). „Röntgendiagnostik in der Kleintierpraxis“. Schattauer Verlag, 376–379.
- Hedberg, E. L., Kroese-Deutman, H. C., Shih, C. K., Lemoine, J. J., Liebschner, M. A. K., Miller, M. J., Yasko, A. W., Crowther, R. S., Carney, D. H., Mikos, A. G., und Jansen, J. A. (2005a). „Methods: A Comparative Analysis of Radiography, Microcomputed Tomography, and Histology for Bone Tissue Engineering“. *Tissue Engineering*, 11(9-10), 1356–1367.
- Hedberg, E. L., Kroese-Deutman, H. C., Shih, C. K., Lemoine, J. J., Liebschner, M. A. K., Miller, M. J., Yasko, A. W., Crowther, R. S., Carney, D. H., Mikos, A. G., und Jansen, J. A. (2005b). „Methods: a comparative analysis of radiography, microcomputed tomography, and histology for bone tissue engineering“. *Tissue Engineering*, 11(9-10), 1356–1367.
- Hedrich, H.-J. (1990). *Genetic monitoring of inbred strains of rats: a manual on colony management, basic monitoring techniques, and genetic variants of the laboratory rat*. Gustav Fischer Verlag.
- Heng, B. C., Cao, T., Stanton, L. W., Robson, P., und Olsen, B. (2004). „Strategies for Directing the Differentiation of Stem Cells Into the Osteogenic Lineage In Vitro“. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(9), 1379–1394.
- Hernigou, P., Poignard, A., Beaujean, F., und Rouard, H. (2005). „Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells“. *J Bone Joint Surg Am*, 87(7), 1430–1437.
- Hicok, K. C., Du Laney, T. V., Zhou, Y. S., Halvorsen, Y.-D. C., Hitt, D. C., Cooper, L. F., und Gimble, Jeffrey M. (2004a). „Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo“. *Tissue Engineering*, 10(3-4), 371–380.

- Higashi, S., Yamamuro, T., Nakamura, T., Ikada, Y., Hyon, S. H., und Jamshidi, K. (1986). „Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers“. *Biomaterials*, 7(3), 183–187.
- Hofmann, C., von Garrel, T., und Gotzen, L. (1996). „Bone bank management using a thermal disinfection system (Lobator SD-1). A critical analysis = Knochenbankmanagement bei Verwendung eines thermischen Desinfektionssystem (Lobator SD-1). Eine kritische Analyse“. *Der Unfallchirurg*, 99(7), 498–508.
- Hollinger, J O, und Kleinschmidt, J. C. (1990). „The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials“. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 1(1), 60–68.
- Holmes, R. E., Cohen, S. R., Cornwall, G. B., Thomas, K. A., Kleinhenz, K. K., und Beckett, M. Z. (2004). „MacroPore resorbable devices in craniofacial surgery“. *Clinics in Plastic Surgery*, 31(3), 393–406.
- Horch, H.-H. (2006). „Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Praxis der Zahnheilkunde“. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Praxis der Zahnheilkunde*, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 58–184.
- Horch, H.-H., und Pautke, C. (2006). „Regeneration statt RepARATION“. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 10(4), 213–220.
- Horner, E. A., Kirkham, J., Wood, D., Curran, S., Smith, M., Thomson, B., und Yang, X. B. (2010). „Long Bone Defect Models for Tissue Engineering Applications: Criteria for Choice“. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(2), 263–271.
- Hougen, H. P., Klausen, B., Stenvang, J. P., Kraemmer, J., und Rygaard, J. (1987). „Effects of xenogeneic, allogeneic and isogeneic thymus grafts on lymphocyte populations in peripheral lymphoid organs of the nude rat“. *Laboratory Animals*, 21(2), 103–111.
- Huang, Jerry I., Zuk, P. A., Jones, Neil F., Zhu, M., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H., und Benhaim, P. (2004). „Chondrogenic Potential of Multipotential Cells from Human Adipose Tissue.“ *Plastic & Reconstructive Surgery February 2004*, 113(2), 585–594.
- Hujoel, P. P., und DeRouen, T. A. (1992). „Validity issues in split-mouth trials“. *Journal of Clinical Periodontology*, 19(9 Pt 1), 625–627.
- Hujoel, P. P., und Loesche, W. J. (1990). „Efficiency of split-mouth designs“. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(10), 722–728.
- Hurley, L. A., Stinchfield, F. E., Basset, A. L., und Lyon, W. H. (1959). „The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions“. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 41-A, 1243–1254.
- Hutmacher, D. W. (2000). „Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage“. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543.
- Hutmacher, D. W., Schantz, J. T., Lam, Christopher Xu Fu, Tan, K. C., und Lim, T. C. (2007). „State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective“. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4), 245–260.

- Hutmacher, D. W., und Vanscheidt, W. (2002). „Matrices for tissue-engineered skin“. *Drugs of Today (Barcelona, Spain: 1998)*, 38(2), 113–133.
- Ignatius, A. A., Betz, O., Augat, P., und Claes, L. E. (2001). „In vivo investigations on composites made of resorbable ceramics and poly(lactide) used as bone graft substitutes“. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(6), 701–709.
- Inoue, H., Ohsawa, I., Murakami, T., Kimura, A., Hakamata, Y., Sato, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okada, T., Ozawa, K., Francis, J., Leone, P., und Kobayashi, E. (2005). „Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 288–295.
- Isogai, N., Landis, W. J., Mori, R., Gotoh, Y., Gerstenfeld, L. C., Upton, J., und Vacanti, J. P. (2000). „Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105(3), 953–963.
- Ito, K., Yamada, Yoichi, Naiki, T., und Ueda, M. (2006). „Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma“. *Clinical Oral Implants Research*, 17(5), 579–586.
- Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, Jeffery M., und Bunnell, B. A. (2006). „Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue“. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(5), 1285–1297.
- James, J. I. (1953). „Tuberculosis transmitted by banked bone“. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 35-B(4), 578.
- Jeon, O., Rhie, J. W., Kwon, I.-K., Kim, J.-H., Kim, B.-S., und Lee, S.-H. (2008). „In Vivo Bone Formation Following Transplantation of Human Adipose-Derived Stromal Cells That Are Not Differentiated Osteogenically“. *Tissue Engineering Part A*, 14(8), 1285–1294.
- Jerosch, J., Castro, W. H. M., Granrath, M., und Rosin, H. (1990). „Knochenbanken in der BRD. Ergebnisse einer Befragung“. *Der Unfallchirurg*, 93(7), 334–338.
- Jones, A. C., Arns, C. H., Sheppard, A. P., Hutmacher, Dietmar W., Milthorpe, B. K., und Knackstedt, M. A. (2007). „Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT“. *Biomaterials*, 28(15), 2491–2504.
- Jorgensen, S. M., Demirkaya, O., und Ritman, E. L. (1998). „Three-dimensional imaging of vasculature and parenchyma in intact rodent organs with X-ray micro-CT“. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 275(3), H1103–H1114.
- Kahnberg, K. E. (1979). „Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf“. *International Journal of Oral Surgery*, 8(6), 449–456.
- Kakudo, N., Shimotsuma, A., Miyake, S., Kushida, S., und Kusumoto, K. (2008). „Bone tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold“. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(1), 191–197.

- Kanou, M., Ueno, T., Kagawa, T., Fujii, T., Sakata, Y., Ishida, N., Fukunaga, J., und Sugahara, T. (2005). „Osteogenic potential of primed periosteum graft in the rat calvarial model“. *Annals of Plastic Surgery*, 54(1), 71–78.
- Karring, T., Nyman, Sture, Gottlow, Jan, und Laurell, L. (1993). „Development of the biological concept of guided tissue regeneration animal and human studies“. *Periodontology* 2000, 1(1), 26–35.
- Kasten, P., Luginbühl, R., Vogel, J., Niemeyer, P., Weiss, S., van Griensven, M., Krettek, C., Bohner, M., Bosch, U., und Tonak, M. (2004). „Induktion von Knochengewebe auf unterschiedlichen Matrices: Eine In-vitro- und In-vivo-Pilotstudie in der SCID Maus“. *Zeitschrift für Orthopädie*, 142(4), 467–475.
- Kasten, P., Vogel, J., Geiger, F., Niemeyer, P., Luginbühl, R., und Szalay, K.. (2008). „The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects“. *Biomaterials*, 29(29), 3983–3992.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., und Bieback, K. (2006). „Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue“. *Stem Cells*, 24(5), 1294–1301.
- Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Mitsuyama, H., Nakamura, H., Katoh, M., und Ishiguro, N. (2004). „Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis--a preliminary result of three cases“. *Bone*, 35(4), 892–898.
- Klausen, B., und Hougen, H. P. (1987). „Quantitative studies of lymphoid organs, blood and lymph in inbred athymic and euthymic LEW rats under germfree and specified-pathogen-free conditions“. *Laboratory Animals*, 21(4), 342–347.
- Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., und Horch, R. E. (2006). „Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view“. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(1), 7–19.
- Koch, T. G., Berg, L. C., und Betts, D. H. (2008). „Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine“. *The Canadian Veterinary Journal*, 49(10), 1009–1017.
- Koeck, B., und Wagner, W. (1996). „Implantologie“. Urban & Schwarzenberg, 177–218.
- Kostopoulos, L., Karring, T., und Uraguchi, R. (1994). „Formation of jawbone tuberosities by guided tissue regeneration. An experimental study in the rat“. *Clinical Oral Implants Research*, 5(4), 245–253.
- Krämer, J., Grifka, J., und Kramer, J. (2007). „Orthopädie, Unfallchirurgie“. Springer, 35–37.
- Kramer, M. (2004). „Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie“. Schlütersche, 280.
- Lacroix, P. (1945). „Recent investigation into the growth of bone“. *Nature*, (156), 576–581.



- Lang, N. P., Hämmerle, C., Oesch, B., und Schenk, R. K. (2000). „Risk of transmission of agents associated with Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 105(6), 2273–2275.
- Langer, R., und Vacanti, J. P. (1993). „Tissue engineering“. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926.
- Laurencin, C., Khan, Y., und El-Amin, S. F. (2006). „Bone graft substitutes“. *Expert Review of Medical Devices*, 3(1), 49–57.
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., und Cooper, J. A. (1999). „Tissue Engineering: Orthopedic Applications“. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 1(1), 19–46.
- Lee, J. A., Parrett, B. M., Conejero, J. A., Laser, J., Chen, John, Kogon, A. J., Nanda, D., Grant, R. T., und Breitbart, A. S. (2003). „Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells“. *Annals of Plastic Surgery*, 50(6), 610–617.
- Lee, J.-H., und Kemp, D. M. (2006). „Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(3), 882–888.
- Lee, L.-T., Kwan, P.-C., Chen, Y.-F., und Wong, Y.-K. (2008). „Comparison of the Effectiveness of Autologous Fibrin Glue and Macroporous Biphasic Calcium Phosphate as Carriers in the Osteogenesis Process With or Without Mesenchymal Stem Cells“. *Journal of the Chinese Medical Association*, 71(2), 66–73.
- Lee, M. Y., Finn, H. A., Lazda, V. A., Thistlethwaite, J. R. J., und Simon, M. A. (1997). „Bone Allografts Are Immunogenic and May Preclude Subsequent Organ Transplants“. *Clinical Orthopaedics & Related Research The Rheumatoid Foot*, 215–219.
- Lee, O. K. (2008). „Fibrin Glue as a Vehicle for Mesenchymal Stem Cell Delivery in Bone Regeneration“. *Journal of the Chinese Medical Association*, 71(2), 59–61.
- Lee, O. K., Coathup, M. J., Goodship, A. E., und Blunn, G. W. (2005). „Use of mesenchymal stem cells to facilitate bone regeneration in normal and chemotherapy-treated rats“. *Tissue Engineering*, 11(11-12), 1727–1735.
- Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., Bae, Y. C., und Jung, J. S. (2004). „Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue“. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 14(4-6), 311–324.
- Lei, H., Xiao, R., Tang, X. J., und Gui, L. (2009). „Evaluation of the efficacy of platelet-rich plasma in delivering BMSCs into 3D porous scaffolds“. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(2), 679–691.
- Lendeckel, S., Jödicke, A., Christophis, P., Heidinger, K., Wolff, J., Fraser, J. K., Hedrick, M. H., Berthold, L., und Howaldt, H.-P. (2004). „Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report“. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 32(6), 370–373.

- Levenberg, S., und Langer, Robert. (2004). „Advances in Tissue Engineering“. Academic Press, 113–134.
- Lewandrowski, K.-U., D. Gresser, J., Wise, D. L., und Trantolo, D. J. (2000). „Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats“. *Biomaterials*, 21(8), 757–764.
- Lexer, E. (1908). „Die Verwendung der freien Knochenplastik nebst Versuchen über die Gelenkversteifung und Gelenktransplantation“. *Arch Klein Chir*, 86, 939–954.
- Lieberman, J R, Daluiski, A., Stevenson, S., Wu, L, McAllister, P., Lee, Y. P., Kabo, J. M., Finerman, G. A., Berk, A. J., und Witte, O. N. (1999). „The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats“. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 81(7), 905–917.
- Liebich, H.-G., Böck, P., und Budras, K.-D. (2003). „Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis“. Schattauer, 88–98.
- Lin, Y., Chen, Xizhe, Yan, Z., Liu, L., Tang, W., Zheng, X., Li, Z., Qiao, J., Li, Shengwei, und Tian, W. (2006). „Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice“. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 285(1), 69–78.
- Linde, A., Thorén, C., Dahlin, C., und Sandberg, E. (1993). „Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats“. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 51(8), 892–897.
- Liu, B., Cui, L., Liu, G.-P., Cao, Y.-L., Zhu, J.-T., und Cao, Y. (2009). „[Tissue-engineering bone with ADSCs and coral scaffold for repairing of cranial bone defect in canine]“. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi = Zhonghua Zhengxing Waike Zazhi = Chinese Journal of Plastic Surgery*, 25(3), 204–208.
- Long, M. W. (2001). „Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells“. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 27(3), 677–690.
- Ludwig, S. C., und Boden, S. D. (1999). „Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary“. *The Orthopedic Clinics of North America*, 30(4), 635–645.
- Marcacci, M., Kon, Elizaveta, Moukhachev, V., Lavroukov, Andrei, Kutepov, S., Quarto, Rodolfo, Mastrogiacomo, Maddalena, und Cancedda, Ranieri. (2007). „Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study“. *Tissue Engineering*, 13(5), 947–955.
- Mardas, N., Kostopoulos, Lambros, und Karring, Thorkild. (2002). „Bone and suture regeneration in calvarial defects by e-PTFE-membranes and demineralized bone matrix and the impact on calvarial growth: an experimental study in the rat“. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 13(3), 453–462; discussion 462–464.

- Mareschi, K., Biasin, E., Piacibello, W., Aglietta, M., Madon, E., und Fagioli, F. (2001). „Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood“. *Haematologica*, 86(10), 1099–1100.
- Marino, G., Rosso, F., Cafiero, G., Tortora, C., Moraci, M., Barbarisi, M., und Barbarisi, A. (2009). „ $\beta$ -Tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study“. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(1), 353–363.
- Marolt, D., Knezevic, M., und Novakovic, G. (2010). „Bone tissue engineering with human stem cells“. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), 10.
- Marretta, S. M. (2002). „Surgical extraction of the mandibular first molar tooth in the dog“. *Journal of Veterinary Dentistry*, 19(1), 46–50.
- Martin, I., Padera, R. F., Vunjak-Novakovic, G., und Freed, L. E. (1998). „In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues“. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 16(2), 181–189.
- Martinez, E., und Marcos, A. (1992). „Transmission of HCV by organ transplantation“. *The New England Journal of Medicine*, 326(6), 412; author reply 412–413.
- Martínez-Estrada, O. M., Muñoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M., und Vilaró, S. (2005). „Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion“. *Cardiovascular Research*, 65(2), 328–333.
- Matsumoto, D., Sato, Katsujiro, Gonda, K., Takaki, Y., Shigeura, T., Sato, T., Aiba-Kojima, E., Iizuka, F., Inoue, Keita, Suga, Hirotaka, und Yoshimura, K. (2006). „Cell-Assisted Lipotransfer: Supportive Use of Human Adipose-Derived Cells for Soft Tissue Augmentation with Lipoinjection“. *Tissue Engineering*, 12(12), 3375–3382.
- Matzen, M., Kostopoulos, L., und Karring, T. (1996). „Healing of osseous submucous cleft palates with guided bone regeneration“. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery / Nordisk Plastikkirurgisk Forening [and] Nordisk Klubb for Handkirurgi*, 30(3), 161–167.
- McCullen, S. D., Zhu, Y., Bernacki, S. H., Narayan, R. J., Pourdeyhimi, B., Gorga, R. E., und Lobo, E. G. (2009). „Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells“. *Biomedical Materials*, 4(3), 035002.
- Meikle, M. C., Papaioannou, S., Davies, E. H., Mordan, N., und Reynolds, J. J. (1993). „Bone-derived growth factor release from poly(alpha-hydroxy acid) implants in vitro“. *Biomaterials*, 14(3), 177–183.
- Meinhart, J., Fussenegger, M., und Höbling, W. (1999). „Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction“. *Annals of Plastic Surgery*, 42(6), 673–678.
- Melcher, A. H. (1969). „Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat“. *Archives of Oral Biology*, 14(9), 1101–1109.

- Meliga, E., Strem, B. M., Duckers, H. J., und Serruys, P. W. (2007). „Adipose-Derived Cells“. *Cell Transplantation*, 16, 963–970.
- Merten, H., Gruber, R., Nitsch, A., Ludwig, A., und Schliephake, H. (2003). „Evaluation oralchirurgischer Augmentationsmaterialien – Ein tierexperimentell-histomorphologischer Vergleich“. *Implantologie*, (11), 215–236.
- Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., und Suuronen, R. (2009). „Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells“. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(3), 201–209.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., und McKercher, S. R. (2000). „Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow“. *Science*, 290(5497), 1779–1782.
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Halvorsen, Y. D., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., und Gimble, Jeffrey M. (2006). „Immunophenotype of Human Adipose-Derived Cells: Temporal Changes in Stromal-Associated and Stem Cell-Associated Markers“. *Stem Cells*, 24(2), 376–385.
- Mizuno, H. (2009). „Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review“. *Journal of Nippon Medical School*, 76(2), 56–66.
- Mizuno, H., Itoi, Y., Kawahara, S., Ogawa, R., Akaishi, S., und Hyakusoku, H. (2008). „In vivo Adipose Tissue Regeneration by Adipose-Derived Stromal Cells Isolated from GFP Transgenic Mice“. *Cells Tissues Organs*, 187(3), 177–185.
- Mizuno, H., Zuk, P. A., Zhu, M., Lorenz, H. P., Benhaim, P., und Hedrick, and M. H. (2002). „Myogenic Differentiation by Human Processed Lipoaspirate Cells.“. *Plastic & Reconstructive Surgery January 2002*, 109(1), 199–209.
- Moelker, A. D., Baks, T., Wever, K. M. A. M., Spitskovsky, D., Wielopolski, P. A., van Beusekom, H. M. M., van Geuns, R.-J., Wnendt, S., Duncker, D. J., und van der Giessen, W. J. (2007). „Intracoronary delivery of umbilical cord blood derived unrestricted somatic stem cells is not suitable to improve LV function after myocardial infarction in swine“. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(4), 735–745.
- Moore, W. R., Graves, S. E., und Bain, G. I. (2001). „Synthetic bone graft substitutes“. *ANZ Journal of Surgery*, 71(6), 354–361.
- Mulisch, M., und Welsch, U. (2009). „Romeis- Mikroskopische Technik“. Springer, 215–311.
- Murata, M., Huang, B. Z., Shibata, T., Imai, S., Nagai, N., und Arisue, M. (1999). „Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone“. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 28(3), 232–237.
- Murray, G., Holden, R., und Roschlau, W. (1957). „Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity“. *The American Journal of Surgery*, 93(3), 385–387.

- Muschler, G. F., Raut, V. P., Patterson, T. E., Wenke, J. C., und Hollinger, Jeffrey O. (2010). „The Design and Use of Animal Models for Translational Research in Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine“. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(1), 123–145.
- Nakagami, H., Morishita, R., Maeda, K., Kikuchi, Y., Ogihara, T., und Kaneda, Y. (2006). „Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy“. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 13(2), 77–81.
- Natesan, S., Zhang, Ge, Baer, D. G., Walters, T. J., Christy, R. J., und Suggs, L. J. (2011). „A bilayer construct controls adipose-derived stem cell differentiation into endothelial cells and pericytes without growth factor stimulation“. *Tissue Engineering. Part A*, 17(7-8), 941–953.
- Naughton, G., Mansbridge, J., und Gentzkow, G. (1997). „A metabolically active human dermal replacement for the treatment of diabetic foot ulcers“. *Artificial Organs*, 21(11), 1203–1210.
- Neupane, M., Chang, C.-C., Kiupel, M., und Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2008). „Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells“. *Tissue Engineering. Part A*, 14(6), 1007–1015.
- Nickel, R., Schummer, A., und Seiferle, E. (2003). „Lehrbuch der Anatomie der Haustiere 1: Bewegungsapparat: BD I“. Parey, 13–27.
- Niemeyer, P., Vohrer, J., Schmal, H., Kasten, P., Fellenberg, J., Suedkamp, Np, und Mehlhorn, A. (2008). „Survival of human mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue after xenogenic transplantation in immunocompetent mice“. *Cytotherapy*, 10(8), 784–795.
- Niemeyer, P., Krause, U., Punzel, M., Fellenberg, J., und Simank, H.-G. (2003). „Mesenchymale Stammzellen zum Tissue Engineering von Knochen: Dreidimensionale osteogene Differenzierung auf mineralisiertem Kollagen“. *Zeitschrift für Orthopädie*, 141(6), 712–717.
- Niemeyer, P., Szalay, K., Luginbühl, R., Südkamp, N. P., und Kasten, P. (2010). „Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model“. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 900–908.
- Niemeyer, P., Schönberger, T. S., Hahn, J., Kasten, P., Fellenberg, J., Suedkamp, N., Mehlhorn, A. T., Milz, S., und Pearce, S. (2010). „Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration“. *Tissue Engineering. Part A*, 16(1), 33–43.
- Nishimori, M., Yamada, Yoshitsugu, Hoshi, K., Akiyama, Y., Hoshi, Y., Morishima, Y., Tsuchida, M., Fukuhara, S., und Kodera, Y. (2002). „Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan“. *Blood*, 99(6), 1995–2001.
- Nixon, A. J., Dahlgren, L. A., Haupt, J. L., Yeager, A. E., und Ward, D. L. (2008). „Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis“. *American Journal of Veterinary Research*, 69(7), 928–937.

- Obert, M., und Gizewski, E. (2011). „Der Volumen-Computertomograph – VCT“. *Universitätsklinikum Giessen und Marburg*, <[http://www.ukgm.de/ugm\\_2/deu/ugi\\_nrd/4302.html](http://www.ukgm.de/ugm_2/deu/ugi_nrd/4302.html)> (June 28, 2012).
- Obert, M., Schulte-Geers, C., Schilling, R. L., Harth, S., Kläver, M., Traupe, H., Ramsthaler, F., und Verhoff, M. A. (2010). „High-resolution flat-panel volumetric CT images show no correlation between human age and sagittal suture obliteration--independent of sex“. *Forensic Science International*, 200(1-3), 180.e1–12.
- Obert, Martin, Ahlemeyer, B., Baumgart-Vogt, E., und Traupe, Horst. (2005). „Flat-panel volumetric computed tomography: a new method for visualizing fine bone detail in living mice“. *Journal of Computer Assisted Tomography*, 29(4), 560–565.
- Oest, M. E., Dupont, K. M., Kong, H.-J., Mooney, D. J., und Guldberg, R. E. (2007). „Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects“. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 25(7), 941–950.
- Ogawa, R., Mizuno, H., Hyakusoku, H., Watanabe, A., Migita, M., und Shimada, T. (2004). „Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice“. *Journal of Nippon Medical School*, 71(4), 240–241.
- Ohnishi, H., Fujii, N., Futami, T., Taguchi, N., Kusakari, H., und Maeda, T. (2000). „A histochemical investigation of the bone formation process by guided bone regeneration in rat jaws. Effect of PTFE membrane application periods on newly formed bone“. *Journal of Periodontology*, 71(3), 341–352.
- Ono, K., Satoh, M., Yoshida, T., Ozawa, Y., Kohara, A., Takeuchi, M., Mizusawa, H., und Sawada, H. (2007). „Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA“. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43(5-6), 168–175.
- Pacini, S., Spinabella, S., Trombi, L., Fazzi, R., Galimberti, S., Dini, F., Carlucci, F., und Petrini, M. (2007). „Suspension of Bone Marrow–Derived Undifferentiated Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses“. *Tissue Engineering*, 13(12), 2949–2955.
- Pang, E.-K., Im, S.-U., Kim, C.-S., Choi, S.-H., Chai, J.-K., Kim, C.-K., Han, S.-B., und Cho, K.-S. (2004). „Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model“. *Journal of Periodontology*, 75(10), 1364–1370.
- Parenteau, N. (1999). „Skin: the first tissue-engineered products“. *Scientific American*, 280(4), 83–84.
- Parikh, S. N. (2002). „Bone graft substitutes: past, present, future“. *Journal of Postgraduate Medicine*, 48(2), 142–148.
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., und Daley, G. Q. (2008). „Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors“. *Nature*, 451(7175), 141–146.

- Park, S.-Y., Kim, K.-H., Koo, K.-T., Lee, K.-W., Lee, Y.-M., Chung, C.-P., und Seol, Y.-J. (2011). „The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and micro-computed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects“. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 41(5), 218.
- Passier, R., und Mummery, C. (2003). „Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair“. *Cardiovascular Research*, 58(2), 324–335.
- Patka, P., Haarman, H. J., und Bakker, F. C. (1998). „Bone transplantation and bone replacement materials“. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 142(16), 893–896.
- Peptan, I. A., Hong, L., und Mao, J. J. (2006). „Comparison of Osteogenic Potentials of Visceral and Subcutaneous Adipose-Derived Cells of Rabbits“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(5), 1462–1470.
- Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R.-S., Lindenhayn, K., Burmester, G.-R., und Sitter, M. (2000). „Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits“. *Biomaterials*, 21(11), 1145–1153.
- Pineda, L. M., Büsing, M., Meinig, R. P., und Gogolewski, S. (1996). „Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects“. *Journal of Biomedical Materials Research*, 31(3), 385–394.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., und Marshak, D. R. (1999). „Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells“. *Science*, 284(5411), 143–147.
- Planat-Benard, V. (2004). „Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells“. *Circulation Research*, 94(2), 223–229.
- Prolo, D. J., und Rodrigo, J. J. (1985). „Contemporary bone graft physiology and surgery“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (200), 322–342.
- Qu, C., Zhang, Guo-hua, Zhang, L., und Yang, G. (2007). „Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells“. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43(2), 95–100.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., und Marcacci, M. (2001). „Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells“. *The New England Journal of Medicine*, 344(5), 385–386.
- Quarto, R., Thomas, D., und Liang, C. T. (1995). „Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity“. *Calcified Tissue International*, 56(2), 123–129.
- Raggatt, L. J., und Partridge, N. C. (2010). „Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling“. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108.
- Reichardt, B., Sarwar, A., Bartling, S. H., Cheung, A., Grasruck, M., Leidecker, C., Bredella, M. A., Brady, T. J., und Gupta, R. (2008). „Musculoskeletal applications of flat-panel volume CT“. *Skeletal Radiology*, 37(12), 1069–1076.

- Retzepi, M., und Donos, N. (2010). „Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications“. *Clinical Oral Implants Research*, 21(6), 567–576.
- Richardson, L. E., Dudhia, J., Clegg, P. D., und Smith, R. (2007). „Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury“. *Trends in Biotechnology*, 25(9), 409–416.
- Rigol, M., Solanes, N., Farré, J., Roura, S., Roqué, M., Berruezo, A., Bellera, N., Novensà, L., Tamborero, D., Prat-Vidal, C., Huzman, M. Á., Batlle, M., Hoefsloot, M., Sitges, M., Ramírez, J., Dantas, A. P., Merino, A., Sanz, G., Brugada, J., Bayés-Genís, A., und Heras, M. (2010). „Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cell Therapy After Myocardial Infarction: Impact of the Route of Administration“. *Journal of Cardiac Failure*, 16(4), 357–366.
- Rigotti, G., Marchi, A., Gali, M., Baroni, G., Benati, D., Krampera, M., Pasini, A., und Sbarbati, A. (2007). „Clinical Treatment of Radiotherapy Tissue Damage by Lipoaspirate Transplant: A Healing Process Mediated by Adipose-Derived Adult Stem Cells“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 119(5), 1409–1422.
- Robb, R. A., und Hanson, D. P. (1991). „A software system for interactive and quantitative visualization of multidimensional biomedical images“. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine*, 14(1), 9–30.
- Rohen, J. W., und Lütjen-Drecoll, E. (2000). „Funktionelle Histologie“. *Funktionelle Histologie*, Schattauer Verlag.
- Rolstad, B., und Fossum, S. (1987). „Allogeneic lymphocyte cytotoxicity (ALC) in rats: establishment of an in vitro assay, and direct evidence that cells with natural killer (NK) activity are involved in ALC.“ *Immunology*, 60(2), 151–157.
- Rosen, V., Wozney, J. M., Wang, E. A., Cordes, P., Celeste, A., McQuaid, D., und Kurtzberg, L. (1989). „Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone“. *Connective Tissue Research*, 20(1-4), 313–319.
- Rosset, A., Spadola, L., und Ratib, O. (2004). „OsiriX: An Open-Source Software for Navigating in Multidimensional DICOM Images“. *Journal of Digital Imaging*, 17(3), 205–216.
- Rubinstein, P., Rosenfield, R. E., Adamson, J. W., und Stevens, C. E. (1993). „Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution“. *Blood*, 81(7), 1679–1690.
- Rüedi, T. P., und Bassett, C. A. (1967). „Repair and remodeling in Millipore-isolated defects in cortical bone“. *Acta Anatomica*, 68(4), 509–531.
- Rueger, J., Hägele, J., Lehmann, W., Rücker, A., und Schlickewei, C. (2010). „Knochenaufbau – Knochenersatzmaterialien“. *Orthopädie und Unfallchirurgie up2date*, 5(05), 295–314.
- Rueger, J. M. (1998). „Bone replacement materials – state of the art and the way ahead“. *Der Orthopäde*, 27(2), 72–79.



- Runyan, C. M., Jones, D. C., Bove, K. E., Maercks, R. A., Simpson, D. S., und Taylor, J. A. (2010). „Porcine Allograft Mandible Revitalization Using Autologous Adipose-Derived Stem Cells, Bone Morphogenetic Protein-2, and Periosteum“. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 125(5), 1372–1382.
- Saadeh, P. B., Khosla, R. K., Mehrara, B. J., Steinbrech, D. S., McCormick, S. A., DeVore, D. P., und Longaker, M. T. (2001). „Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen“. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 12(6), 573–579.
- Sack, U., Tarnok, A., und Rothe, G. (2006). *Zelluläre Diagnostik - Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Karger.
- Safford, K. M., Hicok, K. C., Safford, S. D., Halvorsen, Y.-D. C., Wilkison, W. O., Gimble, Jeffrey M., und Rice, H. E. (2002). „Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), 371–379.
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., und Reis, R. L. (2004). „Bone tissue engineering: state of the art and future trends“. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743–765.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T. B., Saporta, S., Janssen, W., Patel, N., Cooper, D. R., und Sanberg, P. R. (2000). „Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro“. *Experimental Neurology*, 164(2), 247–256.
- Sandberg, E., Dahlin, C., und Linde, A. (1993). „Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats“. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 51(10), 1106–1114.
- Sandhu, H. S., Grewal, H. S., und Parvataneni, H. (1999). „Bone grafting for spinal fusion“. *The Orthopedic Clinics of North America*, 30(4), 685–698.
- Sawyer, A. A., Song, S. J., Susanto, E., Chuan, P., Lam, C. X. F., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., und Cool, S. M. (2009). „The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2“. *Biomaterials*, 30(13), 2479–2488.
- Schaaf, H., Streckbein, P., Obert, M., Goertz, B., Christophis, P., Howaldt, H.-P., und Traupe, Horst. (2008). „High resolution imaging of craniofacial bone specimens by flat-panel volumetric computed tomography“. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 36(4), 234–238.
- Schäffler, A., und Büchler, C. (2007). „Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells - Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies“. *Stem Cells*, 25(4), 818–827.
- Schiebler, T. H., und Korf, H.-W. (2007). „Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie“. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Springer, 55–60.

- Schieker, M., Heiss, C., und Mutschler, W. (2008). „Knochenersatzmaterialien“. *Der Unfallchirurg*, 111(8), 613–620.
- Schmid, J., Hämmerle, C. H. F., Olah, A. J., und Lang, N. P. (1994). „Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit.“ *Clinical Oral Implants Research*, 5(3), 125–130.
- Schmid, U., Thielemann, F., Weise, K., und Ochs, B. (2007). „Das ‚vitalisierte‘ Allograft als Alternative im Knochenersatz“. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 145(2), 221–229.
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C. L., und Pape, H. C. (2009). „Tissue Engineering von Knochengewebe“. *Der Unfallchirurg*, 112(9), 785–795.
- Schmit-Neuerburg, K.-P. (2001). „Tscherne Unfallchirurgie: Ellenbogen, Unterarm; Hand“. *Tscherne Unfallchirurgie: Ellenbogen, Unterarm; Hand*, Springer, 79.
- Schmitz, J. P., und Hollinger, J O. (1986). „The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (205), 299–308.
- Schmitz, J. P., und Hollinger, J. O. (1988). „A preliminary study of the osteogenic potential of a biodegradable alloplastic-osteoinductive alloimplant“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (237), 245–255.
- Schmitz, J. P., Schwartz, Z, Hollinger, J O, und Boyan, B D. (1990). „Characterization of rat calvarial nonunion defects“. *Acta Anatomica*, 138(3), 185–192.
- Schnorr, B., und Kressin, M. (2006). „Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch“. *Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch*, Georg Thieme Verlag, 228–238.
- Schortinghuis, J., Ruben, J. L., Meijer, H. J. A., Bronckers, A. L. J. J., Raghoobar, G. M., und Stegenga, B. (2003). „Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect“. *Archives of Oral Biology*, 48(2), 155–160.
- Schrooten, J., und Helsen, J. A. (2000). „Adhesion of bioactive glass coating to Ti6Al4V oral implant“. *Biomaterials*, 21(14), 1461–1469.
- Schulte-Geers, C., Obert, M., Schilling, R. L., Harth, S., Traupe, H., Gizewski, E. R., und Verhoff, M. A. (2011). „Age and gender-dependent bone density changes of the human skull disclosed by high-resolution flat-panel computed tomography“. *International Journal of Legal Medicine*, DOI: 10.1007/s00414-010-0544-3.
- Schuurman, H. J., Bell, E. B., Gärtner, K., Hedrich, H. J., Hansen, A. K., Kruijt, B. C., de Vrey, P., Leyten, R., Maeder, S. J., und Moutier, R. (1992). „Comparative evaluation of the immune status of congenitally athymic and euthymic rat strains bred and maintained at different institutes: 1. Euthymic rats“. *Journal of Experimental Animal Science*, 35(1), 16–32.

- Schwartz, Z., Weesner, T., van Dijk, S., Cochran, D. L., Mellonig, J. T., Lohmann, C. H., Carnes, D. L., Goldstein, M., Dean, D. D., und Boyan, B. D. (2000). „Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation“. *Journal of Periodontology*, 71(8), 1258–1269.
- Seo, M. J., Suh, S. Y., Bae, Y. C., und Jung, J. S. (2005). „Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(1), 258–264.
- Simion, M., und Fontana, F. (2004). „Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review“. *Minerva Stomatologica*, 53(5), 191–206.
- Simonds, R. J., Holmberg, S. D., Hurwitz, R. L., Coleman, T. R., Bottenfield, S., Conley, L. J., Kohlenberg, S. H., Castro, K. G., Dahan, B. A., und Schable, C. A. (1992). „Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor“. *The New England Journal of Medicine*, 326(11), 726–732.
- Singh, K., Moyer, H., Williams, J. K., Schwartz, Zvi, und Boyan, Barbara D. (2011). „Fibrin glue: a scaffold for cellular-based therapy in a critical-sized defect“. *Annals of Plastic Surgery*, 66(3), 301–305.
- Slatter, D. H. (2003). „Textbook of small animal surgery“. Elsevier Health Sciences, 1875–1891.
- Smith, R. K. W. (2008). „Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy“. *Disability & Rehabilitation*, 30(20-22), 1752–1758.
- Sogal, A., und Tofe, A. J. (1999). „Risk Assessment of Bovine Spongiform Encephalopathy Transmission Through Bone Graft Material Derived From Bovine Bone Used for Dental Applications“. *Journal of Periodontology*, 70(9), 1053–1063.
- St John, T. A., Vaccaro, A. R., Sah, A. P., Schaefer, M., Berta, S. C., Albert, T., und Hilibrand, A. (2003). „Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting“. *American Journal of Orthopedics (Belle Mead, N.J.)*, 32(1), 18–23.
- Stangenberg, L., Schaefer, Dirk J., Buettner, O., Ohnolz, J., Mobest, D., Horch, Raymund E., Stark, G. Bjorn, und Kneser, Ulrich. (2005). „Differentiation of Osteoblasts in Three-Dimensional Culture in Processed Cancellous Bone Matrix: Quantitative Analysis of Gene Expression Based on Real-Time Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction“. *Tissue Engineering*, 11(5-6), 855–864.
- Steffen, P. C. (2009). „Spontane Endotheliale Differenzierung von humanen fettabgeleiteten Stammzellen“. Text.Thesis.Doctoral, , <<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/6966/>> (June 28, 2012).
- Stetzer, K., Cooper, G., Gassner, R., Kapucu, R., Mundell, R., und Mooney, M. (2000). „Heilungsverhalten und Knochenregeneration von maxillären Osteotomien im experimentellen Kaninchenmodell“. *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie*, 4(8), 516–521.
- Stevens, M. M., und George, J. H. (2005). „Exploring and Engineering the Cell Surface Interface“. *Science*, 310(5751), 1135–1138.

- Stiehler, M., Bünger, C., Baatrup, A., Lind, M., Kassem, M., und Mygind, T. (2009). „Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells“. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89A(1), 96–107.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K., und Hedrick, M. H. (2005). „Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells“. *The Keio Journal of Medicine*, 54(3), 132–141.
- Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A. M., Robbins, R. C., Longaker, Michael T., und Wu, J. C. (2009). „Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15720–15725.
- Sverzut, C. E., Faria, P. E. P., Magdalena, C. M., Trivellato, A. E., Mello-Filho, F. V., Paccola, C. A. J., Gogolewski, Sylwester, und Salata, L. A. (2008). „Reconstruction of Mandibular Segmental Defects Using the Guided-Bone Regeneration Technique With Polylactide Membranes and/or Autogenous Bone Graft: A Preliminary Study on the Influence of Membrane Permeability“. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(4), 647–656.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., und Yamanaka, S. (2007). „Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors“. *Cell*, 131(5), 861–872.
- Taxonera, C. (2009). „Emerging treatments for complex perianal fistula in Crohn’s disease“. *World Journal of Gastroenterology*, 15(34), 4263.
- Tholpady, S. S., Katz, A.J., und Ogle, R. C. (2003). „Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro“. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 272A(1), 398–402.
- Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., Müller, B., und Zulewski, H. (2006). „Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells“. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 341(4), 1135–1140.
- Tollefson, T. T., Senders, C. W., und Sykes, J. M. (2008). „Changing perspectives in cleft lip and palate: from acrylic to allele“. *Archives of Facial Plastic Surgery: Official Publication for the American Academy of Facial Plastic and Reconstructive Surgery, Inc. and the International Federation of Facial Plastic Surgery Societies*, 10(6), 395–400.
- Tomford, W. W. (2000). „Bone allografts: past, present and future“. *Cell and Tissue Banking*, 1(2), 105–109.
- Tønnesen, B., und Rolstad, B. (1983). „In vivo elimination of allogeneic lymphocytes in normal and T-cell-deficient rats. Elimination does not require T cells“. *Scandinavian Journal of Immunology*, 17(4), 303–312.
- Torres, F., Rodrigues, C., Stocchero, I., und Ferreira, M. (2007). „Stem Cells from the Fat Tissue of Rabbits: An Easy-To-Find Experimental Source“. *Aesthetic Plastic Surgery*, 31(5), 574–578.

- Tsuda, H., Wada, T., Yamashita, T., und Hamada, H. (2005). „Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber-mutant adenoviral BMP2 gene“. *The Journal of Gene Medicine*, 7(10), 1322–1334.
- De Ugarte, D. A., Ashjian, P. H., Elbarbary, A., und Hedrick, M. H. (2003). „Future of Fat as Raw Material for Tissue Regeneration“. *Annals of Plastic Surgery February 2003*, 50(2), 215–219.
- De Ugarte, D. A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Zhu, M., Dragoo, J. L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., und Hedrick, M. H. (2003). „Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow“. *Cells Tissues Organs*, 174(3), 101–109.
- Umoh, J. U., Sampaio, A. V., Welch, I., Pitelka, V., Goldberg, H. A., Underhill, T. M., und Holdsworth, D. W. (2009). „In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model“. *Physics in Medicine and Biology*, 54(7), 2147–2161.
- Unger, R. E., Halstenberg, S., Günther, H., Sartoris, A., Brochhausen, C., und Kirkpatrick, C. J. (2009). „Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration“. *Der Orthopäde*, 38(11), 1020–1028.
- Urist, M. R. (1997). „Bone Morphogenetic Protein: The Molecularization of Skeletal System Development“. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(3), 343–346.
- Urist, M. R., Lietze, A., Mizutani, H., Takagi, K., Triffitt, J. T., Amstutz, J., DeLange, R., Termine, J., und Finerman, G. A. (1982). „A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (162), 219–232.
- v. Garrel, T., und Gotzen, L. (1998). „Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking“. *Der Unfallchirurg*, 101(9), 713–727.
- Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., und Shufflebarger, J. (2001). „Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone“. *The New England Journal of Medicine*, 344(20), 1511–1514.
- Vaessen, L. M. B., Broekhuizen, R., Rozing, J., Vos, J. G., und Schuurman, H.-J. (1986). „T-Cell Development during Ageing in Congenitally Athymic (Nude) Rats“. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24(2), 223–235.
- Verhoff, M., Obert, M., Harth, S., Reuß, C., Karger, B., Lazarova, B., Krähahn, J., Ramsthaler, F., und Traupe, H. (2008). „Flat-Panel-Computertomographie in der Rechtsmedizin“. *Rechtsmedizin*, 18(4), 242–246.
- Vertenten, G., Gasthuys, F., Cornelissen, M., Schacht, E., und Vlamincx, L. (2010). „Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics“. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*.

- Vidal, M. A., Kilroy, G. E., Lopez, M. J., Johnson, J. R., Moore, R. M., und Gimble, Jeffrey M. (2007). „Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells“. *Veterinary Surgery*, 36(7), 613–622.
- Vögelin, E., Jones, N F, Huang, J I, Brekke, J. H., und Lieberman, J R. (2005). „Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein“. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 87(6), 1323–1331.
- Vos, J. G., Berkvens, J. M., und Kruijt, B. C. (1980). „The athymic nude rat: I. Morphology of lymphoid and endocrine organs“. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 15(2), 213–228.
- Vos, J. G., Ruitenber, E. J., Van Basten, N., Buys, J., Elgersma, A., und Kruizinga, W. (1983). „The athymic nude rat. IV. Immunocytochemical study to detect T-cells, and immunological and histopathological reactions against *Trichinella spiralis*“. *Parasite Immunology*, 5(2), 195–215.
- Wagner, Wolfgang, Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, Ulf, Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., und Ho, A. D. (2005). „Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood“. *Experimental Hematology*, 33(11), 1402–1416.
- Walker, Jerilyn A, Kilroy, G. E., Xing, J., Shewale, J., Sinha, S. K., und Batzer, M. A. (2003). „Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction“. *Analytical Biochemistry*, 315(1), 122–128.
- Warrer, K., Karring, T, Nyman, S, und Gogolewski, S. (1992). „Guided tissue regeneration using biodegradable membranes of polylactic acid or polyurethane“. *Journal of Clinical Periodontology*, 19(9 Pt 1), 633–640.
- Wenger, A., Stahl, A., Weber, H., Finkenzeller, G., Augustin, H. G., Stark, G B, und Kneser, U. (2004). „Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering“. *Tissue Engineering*, 10(9-10), 1536–1547.
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., und Hows, J. M. (2003). „Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‚stem‘ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not“. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374.
- Weyrauch, K. D., Smollich, A., und Schnorr, B. (1998). „Histologie-Kurs für Veterinärmediziner“. Ferdinand Enke Verlag, 30–32.
- Wiesmann, H. P., Joos, U., und Meyer, U. (2004). „Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering: Part II“. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33(6), 523–530.
- Williams, K. J., Picou, A. A., Kish, S. L., Giraldo, A. M., Godke, R. A., und Bondioli, K. R. (2008). „Isolation and Characterization of Porcine Adipose Tissue-Derived Adult Stem Cells“. *Cells Tissues Organs*, 188(3), 251–258.

- Winking, R. (2001). „Knochenbildung durch equines Biomaterial“. *Implantologie Journal*, 5(5), 83.
- Wislet-Gendebien, S., Hans, G., Leprince, P., Rigo, J.-M., Moonen, G., und Rogister, B. (2005). „Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype“. *Stem Cells*, 23(3), 392–402.
- Witkowska-Zimny, M., und Walenko, K. (2011). „Stem cells from adipose tissue“. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 16(2), 236–257.
- Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., und Black, I. B. (2000). „Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons“. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4), 364–370.
- Wozney, J. M. (1989). „Bone morphogenetic proteins“. *Progress in Growth Factor Research*, 1(4), 267–280.
- Wu, Ling, Wu, Y., Lin, Y., Jing, W., Nie, X., Qiao, J., Liu, L., Tang, W., und Tian, W. (2007). „Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix“. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 301(1), 83–92.
- Wutzler, P., und Sauerbrei, A. (2000). „Virucidal efficacy of a combination of 0.2% peracetic acid and 80% (v/v) ethanol (PAA-ethanol) as a potential hand disinfectant“. *The Journal of Hospital Infection*, 46(4), 304–308.
- Xu, C., Wang, Y., Yu, X., Chen, Xiaofeng, Li, X., Yang, X., Li, Shunong, Zhang, Xiuming, und Xiang, A. P. (2009). „Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering“. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 88A(1), 264–273.
- Yamamoto, T., Gotoh, M., Hattori, R., Toriyama, K., Kamei, Y., Iwaguro, H., Matsukawa, Y., und Funahashi, Y. (2010). „Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: report of two initial cases“. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 17(1), 75–82.
- Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. A., und Evans, G. R. D. (2007a). „In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model“. *Tissue Engineering*, 13(3), 619–627.
- Yoshikawa, H., und Myoui, A. (2005). „Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics“. *Journal of Artificial Organs*, 8(3), 131–136.
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., und Sekiya, I. (2007). „Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle“. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449–462.

- Yoshimura, K., Sato, K., Aoi, N., Kurita, M., Inoue, K., Suga, H., Eto, H., Kato, H., Hirohi, T., und Harii, K. (2008). „Cell-Assisted Lipotransfer for Facial Lipoatrophy: Efficacy of Clinical Use of Adipose-Derived Stem Cells“. *Dermatologic Surgery*, 34(9), 1178–1185.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., und Thomson, J. A. (2007). „Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells“. *Science*, 318(5858), 1917–1920.
- Zahedi, S., Legrand, R., Brunel, G., Albert, A., Dewé, W., Coumans, B., und Bernard, J. P. (1998). „Evaluation of a diphenylphosphorylazide-crosslinked collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats“. *Journal of Periodontology*, 69(11), 1238–1246.
- Zeilinger, M., und Hübl, W. (2006). „Durchflusszytometrie - eine Einführung“. *MTA*, 7.
- Zellin, G., Gritli-Linde, A., und Linde, A. (1995). „Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats“. *Biomaterials*, 16(8), 601–609.
- Zerbo, I. R., lange, G. L. D., Joldersma, M., Bronckers, A. L. J. J., und Burger, E. H. (2003). „Fate of monocortical bone blocks grafted in the human maxilla: a histological and histomorphometric study“. *Clinical Oral Implants Research*, 14(6), 759–766.
- Zhang, Xinping, Awad, H. A., O’Keefe, R. J., Guldberg, R. E., und Schwarz, E. M. (2008). „A Perspective: Engineering Periosteum for Structural Bone Graft Healing“. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 466(8), 1777–1787.
- Zuk, P. A. (2008). „Tissue Engineering Craniofacial Defects With Adult Stem Cells? Are We Ready Yet?“ *Pediatric Research*, 63(5), 478–486.
- Zuk, P. A. (2010). „The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead“. *Mol. Biol. Cell*, 21(11), 1783–1787.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, Jerry I, Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., und Hedrick, M. H. (2002). „Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells“. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, Adam J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., und Hedrick, M. H. (2001). „Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies“. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.



## Kongresse

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden internationalen Kongressen präsentiert:

Malik C.Y., **Jaekel S.**, Obert M., Zahner D., Kramer M., Koehler K., Schaaf H., Howaldt H.-P., Streckbein P. 2010. Reconstruction of critical size mandibular defects of the immunoincompetent rat with human adult stemcells. e-Poster n° EACMFS\_2010-787. XX Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.

Philipp Streckbein, **Sven Jäckel**, Christoph Yves Malik, Martin Obert, Christopher Kähling, Jan-Falco Wilbrand, Kernt Köhler, Martin Kramer, Hans-Peter Howaldt. 2012. RECONSTRUCTION OF CRITICAL SIZE MANDIBULAR DEFECTS OF THE ATHYMIC RAT WITH HUMAN ADIPOSE DERIVED STROMAL CELLS (ADSC). Abstract number: O-3307. XXI Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.

## Anhang

Medium	Zeit (h)	Temperatur (°C)
Ethanol 50%	0,5	37
Ethanol 70%	1	37
Ethanol 80%	1	37
Ethanol 90%	0,75	37
2-Propanol 100%	1	37
2-Propanol 100%	1	37
Xylol	1,5	40
Xylol	1,5	40
Xylol	1	40
Paraffin	1	60
Paraffin	1	60
Paraffin	1	60
Paraffin	1,5	60

**Tabelle 5** Entwässerungs- und Einbettprotokoll: Entwässerung der histologischen Präparate mit einer in der Konzentration aufsteigenden Ethanolreihe. Es folgt eine Inkubation in einem Intermediärmedium (Xylol). Das gesamte Protokoll wurde in einem Gewebeerwässerungs- und Einbettautomaten Tissue Tek VIP 5 Jr. (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Hilfe einer Paraffinausgießkonsole Tissue-Tek TEC 5 (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) in heißes Paraffin eingebracht.

Nr.	Medium	Zeit (Minuten)	Nr.	Medium	Zeit (Minuten)
1	Xylol	2	12	Wässerung	5
2	Xylol	2	13	HCL-Alkohol	1 Sekunden
3	2-Propanol	2	14	Eosin	1,5
4	2-Propanol	2	15	Ethanol 96%	1
5	Ethanol 96%	2	16	Ethanol 96%	0,5
6	Ethanol 96%	1	17	Ethanol 96%	0,5
7	Ethanol 70%	0,5	18	2-Propanol	0,5
8	Lösung nach Kardasewitsch	4	19	2-Propanol	0,5
9	Spülung mit Leitungswasser	4	20	Xylol	0,5
10	Spülung mit Leitungswasser	2	21	Xylol	0,5
11	Hämatoxylin	4	22	Xylol	0,5

**Tabelle 6** Hämatoxylin-Eosin Färbeprotokoll: die Färbung der histologischen Proben wurde unter einem standardisierten Protokoll mit einem Färbeautomaten VARISTAIN 24-3 (Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Zu sehen sind Färbeschritt, Medium und Einwirkzeit des Mediums auf die histologische Probe.

Nr.	Medium	Zeit	Nr.	Medium	Zeit
1	Xylol	2 Stunden	10	Spülung unter Leitungswasser	10 Minuten
2	Xylol	2 Stunden	11	Färben mit Säurefuchsin-Ponceau	10 Minuten
3	2-Propanol	2 Stunden	12	Spülen mit 1% Essigsäure	30 Sekunden
4	2-Propanol	2 Stunden	13	Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung bis das Bindegewebe weitgehend entfärbt ist	Bis zu 30 Minuten
5	Ethanol 96%	2 Stunden	14	Spülen mit 1% Essigsäure	30 Sekunden
6	Ethanol 96%	1 Stunde	15	Gegenfärbung mit Lichtgrün	5 Minuten
7	Ethanol 70%	30 Minuten	16	Spülen mit 1% Essigsäure	5 Minuten
8	Spülung unter Leitungswasser	30 Sekunden	17	aufsteigende Ethanolreihe (96%, 96%, 100%)	Jeweils 30 Sekunden
9	Kernfärbung mit Weigertschem Eisenhämatoxylin	1-2 Minuten	18	Xylol	30 Sekunden

**Tabelle 7** Färbeprotokoll nach Goldner (Modifikation der Massonschen Trichromfärbung): die Färbung der histologischen Proben wurde unter einem standardisierten Protokoll mit einem Färbeautomaten VARISTAIN 24-3 (Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Zu sehen sind Färbeschritt, Medium und Einwirkzeit des Mediums auf die histologische Probe.

Nr.	Medium	Zeit	Nr.	Medium	Zeit
1	Xylol	2 Stunden	11	Hämalaun	5 Minuten
2	Xylol	2 Stunden	12	Spülen mit Leitungswasser	10 Minuten
3	2-Propanol	2 Stunden	13	Säurefuchsinlösung	5 Minuten
4	2-Propanol	2 Stunden	14	Spülen mit Leitungswasser	30 Sekunden
5	Ethanol 96%	2 Stunden	15	Phosphormolybdänsäure	5 Minuten
6	Ethanol 96%	1 Stunde	16	Methylblau Lösung	2-5 Minuten
7	Ethanol 70%	30 Minuten	17	Spülung mit Leitungswasser	30 Sekunden
8	Spülung unter Leitungswasser	30 Sekunden	18	aufsteigende Ethanolreihe (96%, 96%, 100%)	Jeweils 30 Sekunden
9	Celestinblaulösung	5 Minuten	19	Xylol	30 Sekunden
10	Spülung unter Leitungswasser	30 Sekunden			

**Tabelle 8** Masson-Trichrom Färbeprotokoll: die Färbung der histologischen Proben wurde unter einem standardisierten Protokoll mit einem Färbeautomaten VARISTAIN 24-3 (Shandon GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) durchgeführt. Zu sehen sind Färbeschritt, Medium und Einwirkzeit des Mediums auf die histologische Probe.

## A. Reagenzien

Name	Abkürzung	Information	Katalognummer	Firma/Ort
Alexa Fluor(R) 488 anti-human CD105, Klon 43A3, Mouse IgG1, kappa		Klon: 43A3, Markierung: Alexa Fluor(R) 488, Art: MAK, Spezies- Spezifität: Hu, Host: Ms, Isotyp: IgG1, kappa, 25 tests	No. BLD-323209	BioLegend Europe BV, 1422 DS Uithoorn, Niederlande, bezogen über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Deutschland
PE anti-human CD49d, Klon 9F10, Mouse IgG1, kappa		Klon: 9F10, Markierung: PE, Art: MAK, Spezies-Spezifität: Hu, Kreuzreaktivität: Chimp, Baboon, Cynomolgus, Rhesus, Horse, Bov, Sh, Dog, Fel; Host: Ms, Isotyp: IgG1, kappa, 25 tests	No. BLD-304303	BioLegend Europe BV, 1422 DS Uithoorn, Niederlande, bezogen über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Deutschland

PE anti-human CD166, Klon 3A6, Mouse IgG1, kappa		Klon: 3A6, Markierung: PE, Art: MAK, Spezies-Spezifität: Hu, Host: Ms, Isotyp: IgG1, kappa, 25 tests	No. BLD-343903	BioLegend Europe BV, 1422 DS Uithoorn, Niederlande, bezogen über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Deutschland
APC/Cy7 anti- human CD13, Klon WM15, Mouse IgG1, kappa		Klon: WM15, Markierung: APC/Cy7, Art: MAK, Spezies- Spezifität: Hu Kreuzreaktivität: Chimp, Host: Ms, Isotyp: IgG1, kappa, 100 tests	No. BLD-301710	BioLegend Europe BV, 1422 DS Uithoorn, Niederlande, bezogen über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Deutschland

# Anhang

Alexa Fluor(R) 647 anti-human STRO-1, Klon STRO-1, Mouse IgM, lambda		Klon: STRO-1, Markierung: Alexa Fluor(R) 647, Art: MAK, Spezies- Spezifität: Hu, Host: Ms, Isotyp: IgM, lambda, 25 tests	No. BLD-340103	BioLegend Europe BV, 1422 DS Uithoorn, Niederlande, bezogen über Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85386 Eching, Deutschland
Anti-Mitochondria, surface of intact mitochondria, clone 113-1		Species Reactivity: Human, not rat or mouse, Isotype: IgG1, Host: Mouse	No. MAB1273	Millipore GmbH, 65824 Schwalbach/T s Deutschland
Anti-Nuclei, clone 235-1		Species Reactivity: Human Only, Isotype: IgG1, Control: All human cell types, Host: Mouse	No. MAB1281	Millipore GmbH, 65824 Schwalbach/T s Deutschland
Dulbecco`s PBS (1x) w/o Ca & Mg	PBS	Volume 500 ml, ohne Ca und Mg	No. H15-002	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland



## Anhang

Dimethylsulfoxid	DMSO	ACS spectro- photometric grade ≥99.9%, Volume 100 ml	No. 154938	Sigma- Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Fetal Bovine Serum	FBS	sterile-filtered, non-USA origin, cell culture tested, Volume 500 ml	No. F-7524	Sigma- Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Ham`s F-10 with L- Glutamine		Volume 500 ml	No. E15-815	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland
L-Glutamine		200 mM Concentrate, Volume 100 ml	No. M11-004	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland
Liberase TL Research Grade		low Thermolysin concentration, Volume: 2x 5 mg	No. 05401020001	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol		liquid, cell culture tested, Volume 100 ml	No. M-7522	Sigma – Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland

# Anhang

MEM-Aminosäuren (50x) ohne L- Glutamin		Volume 100 ml	No. K0363	Biochrom AG, 12247 Berlin, Deutschland
Penicillin/Strepto- mycin		100x Concentrate, Volume 100 ml	No. P11-010	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland
Trypsin, 0.05% (1X) with EDTA 4Na, liquid		Volume 500 ml	No. 25300-062	Invitrogen GmbH, 64293 Darmstadt, Deutschland
Ringer- Infusionslösung		Volume 500 ml		B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
Stain Buffer		Volume 500 ml	No. 554656	Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
BD CompBeads Anti-Mouse Ig, kappa, BD CompBeads Compensation Particles Anti-Mouse Ig, kappa/Negative Control(BSA) Set		Volume 6 ml	No. 552843	Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland

## Anhang

Hexamethyl- disilazane	HMDS	Volume 326 ml	No. 00692	Polysciences Europe GmbH, 69214 Eppelheim, Deutschland
---------------------------	------	---------------	-----------	--

### B. Lösungen

**β-Mercaptoethanol** 50 ml Dulbecco's PBS ohne Ca & Mg und 35 µl 2-Mercaptoethanol

EDTA-Lösung 20%	Firma	Menge
Na-EDTA	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland	200g
destilliertes Wasser		800
NaOH (40 %)		bis pH sich bei 7,4 einstellt

### C. Medien zur Kultivierung von Zellen

Expansionsmedium	Firma	Menge
Ham's F-10 with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland	500 ml
$\beta$ -MercaptoethanolLösung		5 ml
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland	2,5 ml
MEM-Aminosäuren (50x) ohne L-Glutamin	Biochrom AG, 12247 Berlin, Deutschland	5 ml
Hitzeinaktiviertes Fetal Bovine Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland	57,5 ml
L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, 35091 Cölbe, Deutschland	2,5 ml

Einfriermedium	Firma	Menge
Expansionsmedium		36 ml
Hitzeinaktiviertes Fetal Bovine Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland	10 ml
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland	4 ml

**D. Geräte und Verbrauchsmaterialien**

<b>Name</b>	<b>Information</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Firma/Ort</b>
Thermo Scientific Heraeus BBD6220 CO <sub>2</sub> -Inkubator			Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, 53113 Bonn, Deutschland
Cell dissociation sieve-Tissue Grinder Kit	Components Kit contains one 85 mL cup, 5 each of 40, 50 and 60 mesh screens, 5 screen replacement keys and 2 glass pestles	No. CD1-1KT	Sigma-Aldrich, 82024 Taufkirchen, Deutschland
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flaschen	Flache Form, 175 cm <sup>2</sup>	No. 660175	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickhausen und 42719 Solingen, Deutschland
BD Falcon™ Conical Tubes 50 ml	50 ml high-clarity polypropylene conical centrifuge tube, 9400 RCF rating	No. 352098	Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland
Haemocytometer- Deckgläser	Für Zählkammern. CE-zertifiziert, optisch planparallel geschliffen, Stärke 0,4 mm.	No. L190.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

# Anhang

'Mr. Frosty", 1,2 / 2 ml Einfriergerät		No. 9400945	Fisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte, Deutschland
Leica DM IL LED	Inverses Labormikroskop mit LED-Beleuchtung	No. 090-131-001	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland
Pipetus® Pipettierhilfe		No. 9903000	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt, Deutschland
Messpipette, B	5, 10 ml	No. 1000153 , No. 1000160	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt, Deutschland
Messpipette	2 ml	No. 1471111351	Kalensee Herbert Laborgroßhandlung und Glasbläserei, 35392 Gießen, Deutschland
Messpipette	25 ml	No. 27179	Brand GmbH + Co KG, 35392 Gießen, Deutschland
serologische Pipette	2, 5, 10, 25 ml	No. 710180, 606180, 607180, 760180	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen und 42719 Solingen, Deutschland

## Anhang

Pipette Reference® (Variabel)	10 - 100 µl und 0,5- 10 µl	No. 4910 000.042, No. 4910 000.018	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. Pipettenspitzen	0,5 - 20 µl, 2- 200 µl	No. 0030 000.854, No. 0030 000.870	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Safe-Lock Reaktionsgefäße	0,5 ml, 500 Stück	No. 0030 121.023	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Model: E5 ET 231220		Dinkelberg analytics GmbH, 86456 Gablingen, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Zur Leukozyten-, Thrombozyten- und Erythrozytenzählung.	No. T729.1	Carl Roth GmbH und Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Heraeus Labofuge 400R Benchtop Centrifuge		No. 75008162	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, 53113 Bonn, Deutschland
HERAsafe Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Klasse II		Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, 53113 Bonn, Deutschland

## Anhang

Cryo.s™ Einfrierröhrchen	1 ml	No. F071005	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen und 42719 Solingen, Deutschland
Zellkulturschalen	35 x 10 mm, 8,7 cm² Wachstumsfläche	No. 627 160	Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen und 42719 Solingen, Deutschland



## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Howaldt für die interessante Themenstellung und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die zur Verfügung gestellten Mittel bedanken. Für die gute Betreuung möchte ich mich bei Dr. Dr. Philipp Streckbein und Dr. Dr. Christoph Yves Malik bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer möchte ich für die Beratung während der Anfertigung dieser Dissertation und für seine Unterstützung danken.

Herrn Dr. K. Köhler und seinem Team möchte ich für die Unterstützung und Beratung bei der Erstellung und Auswertung der histologischen Präparate danken.

Herrn Dr. M. Obert möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung der fpvCT Aufnahmen danken.

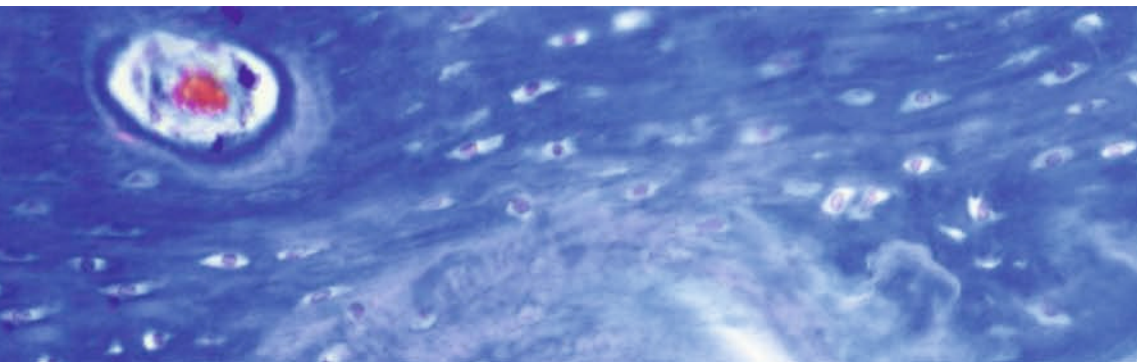
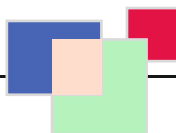
Herrn Prof. Dr. A. Langheinrich und Herrn Dr. M. Kampschulte sowie Frau G. Martels möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung der  $\mu$ -CT Aufnahmen danken.

Herrn Dr. D. Zahner möchte ich für die Beratung bei der tiermedizinischen Betreuung der Versuchstiere danken.

Frau Gilda Kyrok und Frau Myrna Hof möchte ich für die technische Hilfe bei der Betreuung der Zellkultur danken.

Herrn Dr. J. Pons-Kühnemann möchte ich für die statistische Beratung danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, hier besonders bei meinen Eltern, die mir immer den Rücken frei gehalten haben und mich bedingungslos gefördert haben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5965-1



9 783835 959651